

Charakterisierung interindividueller Strahlenempfindlichkeit in Zellen aus Tumorpatienten



Anne Maria Dietz

Charakterisierung interindividueller Strahlenempfindlichkeit in Zellen aus Tumorpatienten

Dissertation an der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Erlangung
des Doktorgrades der Naturwissenschaften



Angefertigt an der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
in der Arbeitsgruppe Molekulare Strahlenbiologie
unter der Leitung von PD. Dr. Anna Friedl

Vorgelegt von
Anne Maria Dietz

München, den 03. Dezember 2014

Erstgutachter: PD Dr. Anna A. Friedl
Zweitgutachter: Prof. Dr. Peter Becker
Tag der mündlichen Prüfung: 05.05.2015

Meinem Vater

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	5
2	Einleitung.....	7
2.1	Individuelle Strahlenempfindlichkeit	7
2.2	Das Chromosomeninstabilitätssyndrom Ataxia Telangiectasia	9
2.3	Biomarker-Entdeckung im Zeitalter der Omics-Technologien	12
2.3.1	Charakterisierung eines validen Biomarkers.....	12
2.3.2	Biomarker für Strahlenempfindlichkeit.....	12
2.3.3	Verschiedene Omics-Technologien und ihre Anwendungen	14
2.4	Protein Biomarker-Entdeckung	17
2.5	Pathway-Analyse zur Biomarker-Detektion	17
2.6	Interindividuelle Strahlenempfindlichkeit in Zelllinien aus Tumorpatienten	18
2.7	Ziel der Arbeit.....	19
3.	Ergebnis	20
3.1	Patientenproben der LUCY-Studie	20
3.2	Etablierung der Versuchsbedingungen für das Screening	20
3.2.1	Screening des Überlebens lymphoblastoider Zelllinien nach Bestrahlung	23
3.3	Karyotypisierung der unterschiedlich strahlenempfindlichen Zelllinien.....	26
3.4	Proteomanalyse zur Identifizierung deregulierter Proteine der Strahlenantwort in LCLs....	27
3.4.1	Hochauflösende Gele für die 2D-Gelelektrophorese	29
3.4.2	Ergebnisse der differentiellen Analyse.....	29
3.4.3	Vergleich der differentiell exprimierten Proteine innerhalb einer Zelllinie zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit 1 Gy und 10 Gy.....	31
3.4.4	Vergleich der differentiell exprimierten Proteine zwischen allen Zelllinien zu einem Zeitpunkt (0,5 h, 4 h und 24 h) nach Bestrahlung mit 1 Gy und 10 Gy	39
3.5	Bioinformatische Analyse der differentiell exprimierten Proteine aus 2D-DIGE mit der Ingenuity Pathway Analysis Software (IPA).....	43
3.5.1	Zelluläre Funktionen der differentiell exprimierten Proteine.....	47
3.5.2	Netzwerke der differentiell exprimierten Proteine.....	53
3.6	Auswahl einzelner Proteine zur Validierung der 2D-DIGE Regulationsfaktoren.....	58
3.7	Validierungen der 2D-DIGE Regulationsfaktoren durch quantitativen Western Blot.....	59
3.7.1	Validierung der Regulationsfaktoren durch Normalisierung mit einer Ladekontrolle..	59

3.7.2	Validierung der Regulation von RAD50 mit der Stain-Free-Methode (BioRad)	67
3.8	Analyse der miRNA-Expression nach ionisierender Strahlung	71
3.8.1	Vergleich der differentiell exprimierten miRNAs zwischen allen Zelllinien zu einem Zeitpunkt (4 h und 24 h) nach Bestrahlung mit 10 Gy	84
3.9	Bioinformatische Netzwerkanalyse der deregulierten Proteine und miRNAs nach Bestrahlung in den Kontrolllinien Linien GM03323(+) und GM03189(-)	88
3.10	Korrelation der WST-1 Viabilitätsdaten 24 h und 48 h nach Bestrahlung mit 10 Gy mit 4 ausgewählten SNPs	93
4	Diskussion	95
4.1	Eignung von EBV-immortalisierten Zelllinien zur Analyse der Strahlenempfindlichkeit.....	95
4.2	Zellüberleben nach Bestrahlung.....	97
4.3	Differentielle Proteom-und MALDI-TOF/MS-Analyse	99
4.4	Western Blot Analyse ausgewählter Kandidatenproteine	104
4.4.1	SND1	104
4.4.2	SerpinB9	105
4.4.3	MCM7	105
4.4.4	RAD50	106
4.5	Differentielle Proteinexpression nach Bestrahlung in unterschiedlich strahlenempfindlichen LCLs	108
4.6	Bioinformatische Analyse der differentiell exprimierten Proteine aus 2D-DIGE mit der Ingenuity-Software	109
4.7	Analyse der miRNA-Expression nach ionisierender Strahlung	113
4.8	Bioinformatische Netzwerkanalyse der deregulierten Proteine und miRNAs 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy in den Linien GM03323(+) und GM03189(-)	115
4.9	Biomarker für Strahlenempfindlichkeit.....	116
5.	Material	118
5.1	Geräte, Chemikalien und Computerprogramme	118
5.1.1	Geräte.....	118
5.1.2	Chemikalien	119
5.1.3	Computerprogramme.....	121
5.2	Verwendete Lösungen und Puffer (Lösung/Puffer-Zusammensetzung/ Hersteller)	121
5.3	Kommerzielle Kits	126
5.4	Verbrauchsmaterialien.....	127
5.5	Verwendete Antikörper und Verdünnungen	128
5.6	Zelllinien und Zellkulturmedien.....	129
5.7	Kontroll-Zelllinien	129

5.8	Zellkulturmedium	129
6	Methoden.....	130
6.1	Zellbiologische Methoden	130
6.1.1	Kultivieren, Vermehren und Passagieren einer Suspensionszellkultur.....	130
6.1.2	Kryokonservierung von Säugerzellen	130
6.1.3	Auftauen von humanen Zellen	130
6.1.4	Zellzahlbestimmung lymphoblastoider Zelllinien.....	131
6.1.5	Anzucht und Aussaat der Zellen für Trypanblautest und WST-1	131
6.1.6	Anzucht und Aussaat für 2D-, bzw. 1D-Gelelektrophorese.....	132
6.1.7	Anzucht und Aussaat für MikroRNA-Analyse	132
6.1.8	Anzucht und Aussaat für mFISH-Analyse	132
6.1.9	Ernte der Zellen für proteinbiochemische Analysen	133
6.2	γ-Bestrahlung der Zelllinien an einer ¹³⁷ Cs-Quelle	133
6.3	Funktionelle Analysen	134
6.3.1	Bestimmung der Vitalität (Trypanblau)	134
6.3.2	Bestimmung der Viabilität (WST-1 Test (water soluble tetrazolium)).	134
6.3.3	Auswertung	135
6.4	MulticolorFISH Analyse (mFISH).....	136
6.4.1	Präparation von Chromosomen	136
6.4.2	Auftropfen der Chromosomen auf Objektträger	136
6.4.3	Denaturierung	137
6.4.4	Hybridisierung	137
6.4.5	Visualisierung der Chromosomen	138
6.4.6	Auswertung	139
6.5	Proteinanalytische Methoden.....	139
6.5.1	2D-Gelelektrophorese	139
6.5.2	Probenvorbereitung für massenspektrometrische Analyse MALDI-TOF/MS	146
6.5.3	Datenbankabgleich.....	149
6.5.4	Western Blot.....	152
6.6	MikroRNA	157
6.6.1	Isolation der RNA.....	157
6.6.2	Konzentrations-und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	158
6.6.3	Reverse Transkription (cDNA-Synthese) von miRNAs für TaqMan®-MicroRNA-Array (TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit)	158

6.6.4	Reverse Transkription zur Detektion von spezifischen miRNAs (TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit)	159
6.6.5	Quantitative Echtzeit (Real-time)-Polymerasekettenreaktion von miRNAs	159
6.6.6	Quantifizierung von miRNAs mittels TaqMan®-MicroRNA-Array	159
6.6.7	Auswertung	160
7	Literaturverzeichnis	161
8.	Anhang.....	176
9.	Publikationen.....	235
9.1	Veröffentlichungen.....	235
9.2	Posterpräsentationen.....	236
9.3	Vorträge.....	237
10	Curriculum Vitae.....	238
11	Danksagung	239
12	Eidesstattliche Erklärung	240

1 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden über ein Screening-Verfahren lymphoblastoide Zelllinien mit unterschiedlicher Strahlenempfindlichkeit von Lungentumorph Patienten identifiziert. Als Kontroll-Zellmodellsystem für Strahlenempfindlichkeit wurde eine etablierte humane lymphoblastoide Zelllinie eines Ataxia telangiectasia (AT)-Patienten (GM03189(-)) und die normale Linie des gesunden Bruders (GM03323(+)) ausgewählt, die eine unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit 24 h und 48 h nach Bestrahlung mit 10 Gy in einer ^{137}Cs -Quelle aufweisen. Basierend auf der mit WST-1 und dem Trypanblau-Ausschlussprinzip gemessenen Viabilität und Vitalität nach Bestrahlung wurden 92 lymphoblastoide Zelllinien von jungen Lungentumorph Patienten aufgrund ihrer Strahlenempfindlichkeit kategorisiert. Hierbei konnten fünf besonders strahlenempfindliche Zelllinien und zwei strahlenresistentere, hier als normal bezeichnete Linien, gefunden werden. Die unterschiedlichen Empfindlichkeiten konnten in unabhängigen Analysen von einem weiteren Labor (ISB, Helmholtz Zentrum München) bestätigt werden. Um die Ursachen der unterschiedlichen intrinsischen Strahlenempfindlichkeit von normalen, sowie strahlensensitiven Zellen zu klären, wurde die Proteinexpression und -regulation näher untersucht. Eine normale (20037) und eine strahlensensitive LUCY-Zelllinie (4060), sowie die Kontrolllinien und eine durchschnittlich empfindliche, normale humane LCL (HuKo) wurden im Bezug auf die Proteinexpression post-Bestrahlung mit 1 Gy bzw. 10 Gy zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten (0,5 h, 4 h und 24 h) mit der 2D-DIGE-Methode untersucht. Generell zeigte sich, dass die Zellantwort auf die Bestrahlung mit 1 Gy bzw. 10 Gy interindividuell sehr unterschiedlich ist. Nach Bestrahlung mit 1 Gy gibt es wenige Proteine, die interindividuell dereguliert sind. Bei den interindividuell gemeinsam, differentiell exprimierten Proteinen handelt es sich zum Großteil um Strukturproteine. Nach Bestrahlung mit 10 Gy sind mehr Proteine zu den drei Zeitpunkten interindividuell gemeinsam dereguliert, jedoch scheint die Strahlenantwort auf Proteinebene für jede Linie einzigartig zu sein.

Die intraindividuelle Proteinexpression zeigt, über den gemessenen zeitlichen Verlauf, nur geringe Veränderungen. Die Deregulation bleibt über alle gemessenen Zeitpunkte für die Mehrzahl der Proteine bestehen. Jedoch sind nach 24 h die meisten differentiell exprimierten Proteine nach Bestrahlung detektierbar. Mit einem Software-basierten, bioinformatischen Ansatz wurden die deregulierten Proteine bestimmten biologischen Funktionen zugeordnet und die Ergebnisse interindividuell verglichen. Aufgrund verschiedener Schwächen der Netzwerk-Analyse-

Programme waren diese Analysen nur bedingt aussagekräftig. Die Aussage, dass die Strahlenantwort interindividuell heterogen ist, konnte jedoch auch hier bestätigt werden.

Die 2D-DIGE Ergebnisse wurden anschließend anhand von vier Kandidatenproteinen im Western Blot validiert. Durch die Untersuchung der Expression des Proteins SND1, das als Co-Aktivator für die Transkription des viralen Proteins EBNA2 fungiert und im Western Blot als nicht signifikant dereguliert bestätigt wurde, konnte in den Zelllinien ausgeschlossen werden, dass die unterschiedlichen, strahlenempfindlichen Phänotypen durch die Expression viraler Gene infolge der Immortalisierung hervorgerufen werden. Die differentielle Expression der Proteine MCM7 und SerpinB9 wurde des Weiteren untersucht, da Unterschiede in der Regulation dieser Proteine zwischen der sensitiven und normalen LUCY-Linie beobachtet wurden, die eine der Ursachen für die unterschiedlichen Empfindlichkeiten darstellen könnten. Die Expression wurde daher in weiteren, unterschiedlich empfindlichen LUCY-Linien untersucht. Es konnten jedoch keine übereinstimmenden Muster in der Expression von MCM7 und SerpinB9 bezüglich des strahlenempfindlichen Phänotyps gefunden werden, die für alle hier untersuchten sensitiven und normalen Linien gültig waren. RAD50 wurde nur in den sensitiven Linien als dereguliert beobachtet. Dass die verminderte Expression von RAD50 für den strahlensensitiven Phänotyp mitverantwortlich ist, muss jedoch in zukünftigen Analysen in den übrigen sensitiven LUCY-Linien bestätigt werden.

Da die Proteinexpression der Regulation durch mikroRNAs unterliegt, wurde in einem weiteren Versuch eine miRNA array Analyse mit den beiden Kontrolllinien und den LUCY-Linien 4060 und 20037 nach Bestrahlung mit 10 Gy zu den Zeitpunkten 4 h und 24 h post-Bestrahlung durchgeführt. Hier bestätigte sich ebenfalls die Beobachtung aus der 2D-Proteinanalyse, dass die Strahlenantwort interindividuell sehr unterschiedlich ist. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Strahlenantwort auf Ebene der miRNAs zeitabhängig ist, da zwischen 4 h und 24 h nur ca. 5,5 % -25 % der miRNAs zu beiden Zeitpunkten gemeinsam exprimiert sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Varianz der Strahlenantwort auf verschiedenen zellulären Ebenen intraindividuell geringer zu sein scheint, als die interindividuelle Varianz, da hier kaum Gemeinsamkeiten detektiert werden konnten. Diese beobachtete Heterogenität lässt mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden eine Generierung von möglichen Biomarkern für Strahlenempfindlichkeit nicht zu. Welche Auswirkungen die differentiellen Expressionsmuster in der Entstehung der unterschiedlichen, strahlenempfindlichen Phänotypen besitzen, bleibt in nachfolgenden Arbeiten zu klären.

2 Einleitung

2.1 Individuelle Strahlenempfindlichkeit

Maligne Tumoren stellen laut Statistik der WHO nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar. Neben der Chemotherapie ist die Radiotherapie das zweitwichtigste therapeutische Konzept zur Behandlung der verschiedensten Tumorarten. Die Anwendung der Radiotherapie wird jedoch oftmals durch das Auftreten von akuten, klinisch sehr unterschiedlich starken radiogenen Nebenwirkungen des Normalgewebes im Bestrahlungsfeld limitiert (Dikomey et al. 2003), weshalb die Normalgewebsreaktion die maximal applizierbare Strahlendosis einschränkt. Aufgrund dessen wird die, während der Therapie applizierte Dosis so gewählt, dass etwa 5-10 % der Radiotherapie-Patienten, die kein Anzeichen für eine Prädisposition aufweisen, bekannte Nebeneffekte des Normalgewebes zeigen (Greve et al. 2012). Diese manifestieren sich beispielsweise in Form von Fibrosen und treten auf, selbst wenn der Therapieansatz (Bestrahlungsart, Gesamtdosis und Dosisfraktionierung) mit dem von Nicht-Betroffenen identisch ist.

Diese breite Streuung in der individuellen Gewebereaktion nach ionisierender Strahlung wurde bereits sehr häufig beschrieben (Bentzen und Overgaard. 1994; Burnet et al. 1998; Raaphorst et al. 2002; Russell und Begg. 2002). Es wird diskutiert, dass dieser Effekt hauptsächlich durch die intrinsische zelluläre Strahlenempfindlichkeit der Betroffenen determiniert ist (Burnet et al. 1996; Andreassen et al. 2002). In Einzelfällen können die akuten Nebenwirkungen sogar zum Tod des Patienten führen (Rogers 2000). Die Streuung der Radiosensitivität in der Bevölkerung wird durch eine Normalverteilung beschrieben (Gaußsche Normalverteilung) (Oppitz et al. 2001).

Bisher ist es nicht möglich, die Erkenntnis über die individuelle Reaktion auf ionisierende Strahlung therapeutisch zu nutzen, da die molekularen Ursachen noch weitgehend unbekannt sind. Eine zuverlässige, prä-therapeutische Identifizierung radiosensitiver Patienten mit Hilfe eines Biomarkers würde eine Verbesserung der Therapie darstellen, da eine individuelle Dosisanpassung erfolgen könnte. Patienten könnten vor schweren, schädigenden Nebenwirkungen der Therapie bewahrt werden, beziehungsweise könnte eine weitestgehende Ausschöpfung der therapeutischen Strahlenapplikation zur besseren lokalen Tumorkontrolle ermöglicht werden.

Es ist bekannt, dass neben weiteren Umweltfaktoren vor allem zwei intrinsische Faktoren für die individuelle Strahlenempfindlichkeit von Bedeutung sind: die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität und die genetische Prädisposition.

Der wohl wichtigste Bestandteil zur Aufrechterhaltung der genomischen Integrität ist die DNA-Schadenantwort (*DNA damage response*; DDR). Der Mechanismus der zytotoxischen Wirkung ionisierender Strahlung manifestiert sich primär in der Schädigung der DNA der Zellen (Turesson et al. 2003). Neben den vielen unterschiedlichen, durch IR induzierten DNA-Schädigungen stellt der DNA Doppelstrangbruch (DSB) die kritischste Form der DNA-Schädigung dar, da kein intakter komplementärer Strang bleibt, der als Matrize genutzt werden kann (van Gent et al. 2001). Die typische Anzahl induzierter Schäden pro appliziertem Gray (Gy) liegt pro Zelle bei ca. 500 Basenschäden, 1000 Einzelstrangbrüchen (*single strand break*, SSB), 40 DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) und 150 DNA-Protein *Crosslinks* und 60 komplexen Schäden, (UNSCEAR, (2000)). Die Variabilität des dosisabhängig induzierten DNA-Schadens ist nicht sehr hoch, weshalb der direkte induzierte DNA-Schaden, wie der DSB, vermutlich nicht für die individuelle Strahlenempfindlichkeit verantwortlich ist (Morgan et al. 1998).

Die Mehrheit der Doppelstrangbrüche kann in Folge der Schadenantwort von den Zellen repariert werden. Die DNA-Schadenantwort ist ein komplexes, hoch dynamisches System, in dem Schaden-erkennende und Schaden-prozessierende Elemente interagieren (Harper und Elledge 2007). In den meisten Zelltypen sind 12-16 h nach Bestrahlung die DNA-Enden der DSB wieder verknüpft (El-Awady et al. 2001). Es konnte beobachtet werden, dass Doppelstrangbrüche, die 24 h nach Bestrahlung noch detektierbar sind, mit der applizierten Dosis ansteigen und diese DSBs mit der zellulären Strahlenempfindlichkeit korrelieren (Zhou et al. 1997). Zellen mit einer hohen Anzahl von verbleibenden DSBs wurden als strahlenempfindlich ermittelt. Die Strahlenempfindlichkeit korreliert demnach mit der individuellen Reparaturkapazität, die aus Unterschieden auf Ebene der DNA-Reparaturproteine, durch Mutationen resultieren kann. So sind Mutationen bekannt, bei denen die Träger nach Strahlenexposition erheblich stärkere Schäden aufweisen, als Menschen, bei denen das betroffene Gen intakt ist (Frankenberg-Schwager 1989).

Mutationen in verschiedenen Komponenten der DNA-Schadenantwort sind bezüglich der Exposition mit ionisierender Strahlung (IR) von großer Bedeutung. Veränderungen in diesen Genen führen zu Defekten in der Regulation des Zellzyklus und einer verminderten Fähigkeit, DNA-Schäden zu reparieren. Dies resultiert in einer Hypersensitivität der Betroffenen gegenüber ionisierender Strahlung und genotoxischen Agenzien. Einige dieser Mutationen sind bereits

phänotypisch auffällig, wie die der Gruppe der Chromosomen-Instabilitätssyndrome. Zu diesen Syndromen gehört u.a. Ataxia telangiectasia (AT), Bloom's-Syndrom (BS), Cockayne's Syndrom (CS), die Fanconi-Anämie (FA) und das Nijmegen-Breakage-Syndrom (NBS) (Nakanishi et al. 2002; Petrini 1999; Digweed 1993). Die Betroffenen sind phänotypisch leicht zu erfassen und somit ist eine bessere Anpassung der Dosis z.B. bei einer Strahlentherapie möglich.

2.2 Das Chromosomeninstabilitätssyndrom Ataxia Telangiectasia

Das als Ataxia telangiectasia bezeichnete Krankheitsbild, welches der rezessiven Vererbung unterliegt, ist in einer Mutation des ATM-Gens (*AT mutated*) determiniert (Savitsky et al. 1995). Die betroffenen Personen zeichnen sich durch eine erhöhte Krebsprädisposition aus. Bei einer durchschnittlichen Lebenserwartung von ~ 30 Jahren beträgt das Lebenszeitrisiko, an Krebs zu erkranken, 30-40 %. Lymphome und Leukämien sind mit einem Anteil von 60-70 % die häufigsten Krebsformen.

Des Weiteren zeichnen sich AT-Patienten durch eine ausgeprägte Sensitivität gegenüber Strahlung und Radiomimetika aus (McKinnon 2004, Meyn 1999). Bereits in den 1970er Jahren deuteten Untersuchungen an primären Hautfibroblasten von AT-Patienten darauf hin, dass sich die Strahlenempfindlichkeit der Betroffenen auch auf zellulärer Ebene in Form eines verminderten Überlebens, sowie einer erhöhten Rate an Chromosomenaberrationen äußert (Cornforth und Bedford 1985, Taylor 1978, Taylor et al. 1975).

Das ATM-Protein hat eine Größe von 370 kDa, gehört zu den Phosphatidyl-inositol-3-Kinase-ähnlichen Kinasen (PIKK) und besitzt eine Serin/Threonin-Kinaseaktivität. ATM ist der wohl wichtigste Signaltransduktor, der durch DNA-Doppelstrangbrüche aktiviert und rekrutiert wird. IR-induzierte DNA-Schäden führen zu einer Veränderung der Chromatinstruktur. Diese induziert die intermolekulare Autophosphorylierung eines ATM-Dimers (oder höher geordneten Polymers) am Serin 1981 und die Dissoziation des vorher stabilen Dimers (Bakkenist und Kastan 2003). Als Serin/Threonin-Proteinkinase phosphoryliert ATM verschiedene Zielproteine, darunter p53 am Serin 15, CHK2 am Threonin 68 und MDM2 am Serin 365 (Abbildung 2.4). Die durch Phosphorylierung aktivierte CHK2 phosphoryliert nun ebenfalls p53 am Serin 20. Durch diese Phosphorylierung und der Phosphorylierung von MDM2 wird die Bindung zwischen p53 und MDM2 gelöst. Dies führt zu einer Erhöhung der freien p53-Proteinkonzentration

(Kastan und Lim 2000). P53 ist ein multifunktionales Protein, welches verschiedene physiologische Prozesse reguliert: Zellzykluskontrolle, Apoptose und DNA-Reparatur (Woods und Vousden 2001).

Nach der Aktivierung bindet p53 sequenzspezifisch an die DNA und erhöht die Expression von Genen, die ein *p53-response-element* in ihrem Promotor oder im Intron besitzen (el-Deiry 1998). P53 dient als Transkriptionsfaktor für mehr als 100 verschiedene Gene (Zhao et al. 2000), mit zahlreichen unterschiedlichen Funktionen, die die Zellzykluskontrolle, Apoptose und die genetische Stabilität betreffen (Vogelstein et al. 2000). Ein weiteres Zielprotein von ATM ist das Histon A2X (H2AX), das am Serin 139 phosphoryliert wird. Dies führt zur Rekrutierung weiterer Proteine zum DSB, die für die DNA-Reparatur benötigt werden. Zu den rekrutierten Proteinen gehören 35BP1 (*p53-binding protein-1*), BRCA1 (*breast-cancer-associated protein-1*), MDC1 (*mediator of DNA-damage checkpoint-1*) und der MRN-Komplex (Motoyama und Naka 2004).

Abbildung 2.1 zeigt eine Übersicht über eine Auswahl von Proteinen, die nach DNA-Schaden durch Aktivierung von ATM rekrutiert werden.

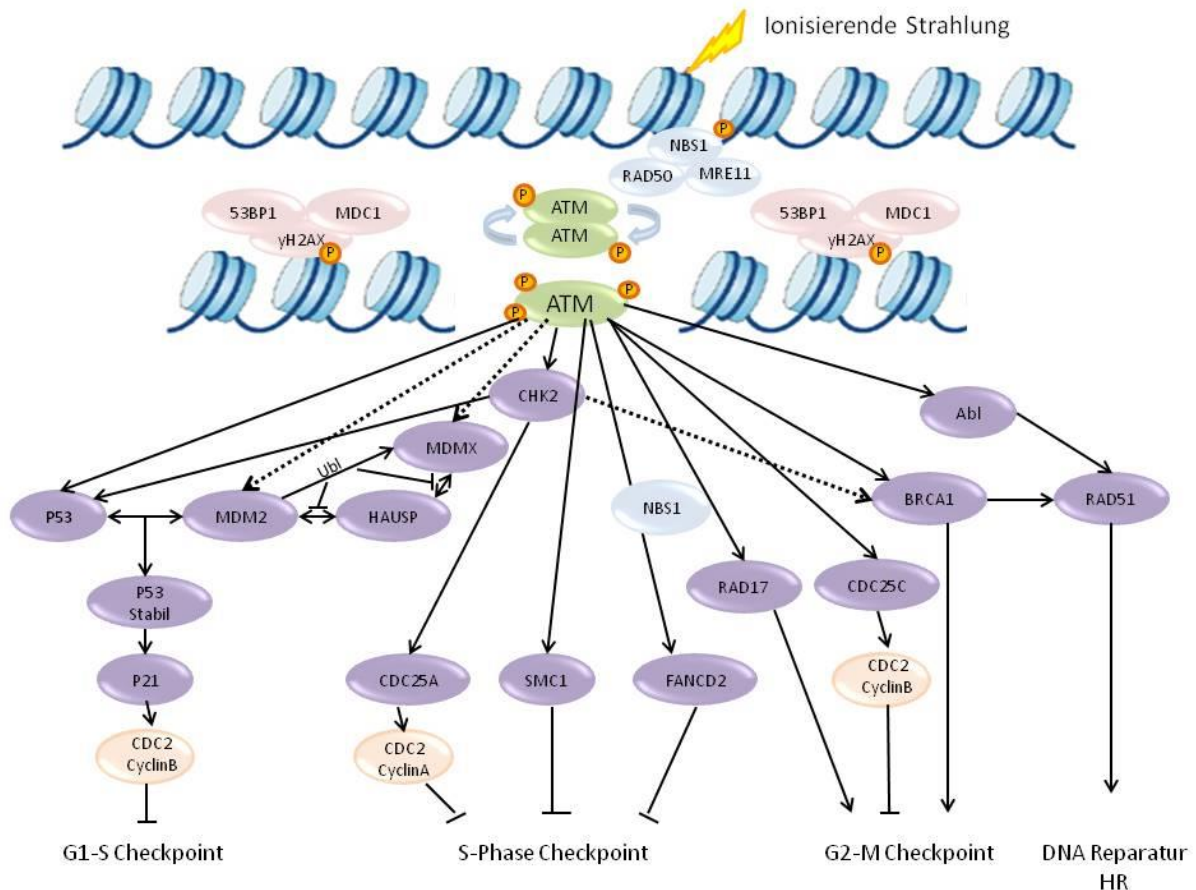


Abbildung 2.1: ATM und die DNA Schadenantwort. In normalen Zellen liegt ATM als inaktives Dimer vor. Nach Erkennen eines DNA Doppelstrangbruchs durch den MRN-Komplex wird ATM aktiviert und das ATM-Dimer/Oligomer dissoziiert durch intermolekulare Autophosphorylierung zum aktiven Monomer. Nach Aktivierung erfolgt *downstream* die Phosphorylierung mehrerer Substrate durch ATM. Die Zielproteine tragen zur Regulation der IR-induzierten Schadenantwort bei. Durch die Phosphorylierung von p53, MDM2 und CHK2 wird der G1-Arrest induziert. Die Phosphorylierung von NBS1, SMC1 und FancD2 arretiert den Zellzyklus in der S-Phase. Der G2-Phase Arrest erfolgt durch Phosphorylierung von BRCA1 und RAD17. Somit ist ATM ein essentielles Protein der DDR (Lavin 2008).

Defekte in ATM führen zu einem Verlust der Fähigkeit, nach Bestrahlung ATM-abhängig aktives p53 zu akkumulieren. Dies führt zu einem eingeschränkten G1/S Checkpoint (Beamish et al. 1994, Kuerbitz et al. 1992). Der Verlust von ATM bei der Induktion des G2/M-Checkpoints führt weiterhin dazu, dass AT-Zellen auch nach IR in der G2-Phase ungehindert in die Mitose übergehen (Beamish et al. 1996). Eine Rolle von ATM bei der Regulation der Apoptose scheint abhängig vom Zelltyp zu sein (Khanna et al. 2001).

2.3 Biomarker-Entdeckung im Zeitalter der Omics-Technologien

2.3.1 Charakterisierung eines validen Biomarkers

Ein Biomarker sollte ein messbarer Faktor sein, der eine Interaktion zwischen einem biologischen System und einem Umwelt-Agens widerspiegelt. Der Umwelteinfluss kann chemischer, physikalischer oder biologischer Natur sein. Die Anwendungsmöglichkeit und Definition von Biomarkern ist vielfältig und immer neue, potentielle Marker werden einhergehend mit den Neuerungen in den Omics-Technologien entdeckt. Die Anforderungen an einen idealen Biomarker bleiben jedoch trotz der Vielzahl der Möglichkeiten bestehen. Die größte Anforderung besteht darin, einen, trotz der großen Variabilität in der Bevölkerung, reproduzierbaren, robusten Marker zu finden, dessen Sensitivität und Spezifität ausreichend ist, um eindeutige Diagnosen zu stellen. Darüber hinaus sollte der Marker in biologischen Proben detektierbar sein, die nicht invasiv gewonnen werden können (Urin, Tränenflüssigkeit, Speichel).

Während ein existierender diagnostischer Marker direkt im Menschen, bzw. an strahlenexponiertem humanem Material (wie Blut, etc.) gemessen wird, ist das wichtigste Werkzeug, um einen geeigneten Biomarker für Strahlenempfindlichkeit zu generieren, die *in vitro* Untersuchung unter genau definierten Versuchsbedingungen. Bioanalysen, die den induzierten Schaden, die Reparaturkapazität und die Überlebensfähigkeit der Zellen messen, sind wichtige Methoden, um die individuelle Strahlenempfindlichkeit zu testen und vorherzusagen. Diese Analysen werden meist mit Hilfe von Zelllinien durchgeführt, die aus humanem Gewebe gewonnen werden. Es ist jedoch zu beachten, dass die Extrapolation der *in vitro* generierten Ergebnisse auf humanes Gewebe aufgrund der systemisch reduzierten Komplexität, im Vergleich zu *in vivo* Untersuchungen stark limitiert ist.

2.3.2 Biomarker für Strahlenempfindlichkeit

Als Tests für Strahlenempfindlichkeit werden bis dato zelluläre und genetische Methoden verwendet, wie die Analyse des Zellüberlebens (Deschavanne et al. 1986), die G₂ chromosomale Radiosensitivität und die Messung von γ -H2AXFoci. Diese Analysen sind zeitaufwendig und können nicht prädiktiv eingesetzt werden.

Die Fortschritte im Bereich der Omics-Technologien ermöglichen immer schnellere und sensitivere Methoden zur Analyse von Expressionsänderungen, Charakterisierung neuer Gen- und Proteinfunktionen, zur Klassifizierung von Genen, Proteinen und Metaboliten in spezifische Signalwege, sowie zur Identifizierung diagnostischer Marker in einem Organismus (Aguilar-Mahecha et al. 2006). Diese Entwicklung verstärkt den Wunsch nach der Entdeckung diagnostischer Marker, die der individuellen Risikoabschätzung nach Exposition mit ionisierender Strahlung dienen. Bei einem diagnostischen Marker handelt es sich um sog. Biomarker, die ubiquitär zur Erkennung exponierter Personen herangezogen werden können. Biomarker können bezüglich IR für eine Vielzahl von Fragestellungen eingesetzt werden (Grandjean 1995), wie (1) die Dosisabschätzung bzw. –validierung der erhaltenen Strahlendosis (2), Untersuchung der individuellen Suszeptibilität (3) und der Früherkennung von Gesundheitsschäden, die durch ionisierende Strahlung verursacht wurden.

Der klassische Ansatz für die Biomarkersuche, bzw. –validierung bedient sich eines Kandidaten, der basierend auf Hypothesen und bekannten Mechanismen ausgewählt wurde, um den gewünschten Endpunkt zu evaluieren. Die modernen *high-throughput* Methoden, oder Omics-Technologien, bieten einen alternativen Ansatz für die Biomarkersuche. Diese Verfahren ermöglichen die Analyse des gesamten Genoms, oder der Veränderungen des Transkriptoms, Proteoms, Epigenoms oder Metaboloms. Im Gegensatz zu dem Hypothese-gesteuerten Ansatz, bieten die o.g. Verfahren die Möglichkeit, Biomarker in einem ungerichteten Ansatz zu identifizieren, da keine Hypothese oder Kenntnis über zugrundeliegende molekulare Mechanismen benötigt wird.

Ein Problem bei der Biomarker-Suche für Strahlenempfindlichkeit stellt die interindividuelle Heterogenität der Strahlensensitivität in der Gesamtbevölkerung dar. Ein geeigneter Biomarker für Strahlenempfindlichkeit muss jedoch interindividuell einsetzbar sein. Dies setzt voraus, dass auf molekularer Ebene gemeinsame Ursachen für die unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit existieren. Da bis zum heutigen Zeitpunkt kein allgemeingültiger Marker zur Risikoabschätzung ionisierender Strahlung existiert, müssen die Methoden für eine Biomarker-Entdeckung sehr sensitiv sein. Die eingesetzten Technologien müssen höchstwahrscheinlich in der Lage sein, viele schwache, also niedrig abundante Signale zu detektieren, um Abweichungen erkennbar zu machen.

2.3.3 Verschiedene Omics-Technologien und ihre Anwendungen

Die Fertigstellung des *Human Genome Project* (HGP) im Jahr 2001 zeigte, dass nur eine relativ niedrige Anzahl von Genen (> 25.000) existiert. Folglich werden komplexe biologische Prozesse auf anderen zellulären Ebenen, als allein durch die DNA-Sequenz, reguliert. Diese Erkenntnis führte zur Entwicklung neuer Methoden im Bereich der Molekularbiologie, die im Vergleich zur früheren Untersuchung von Einzelkomponenten eines biologischen Systems die Analyse komplexer Systeme zulassen. Diese Methoden werden allgemein unter dem Begriff Omics zusammengefasst. Die Omics-Technologien lassen sich in drei Hauptgruppen gliedern: 1. Genomics, 2. Metabolomics, 3. Proteomics.

2.3.3.1 Genomics

Die unter Genomics zusammengefassten Technologien beziehen sich auf das Genom und lassen sich unterteilen in Genotypisierung (1), *Transcriptomics* (2) und *Epigenomics* (3).

- (1) Der Schwerpunkt bei der Genotypisierung liegt in der Identifizierung der physiologischen Funktion der Gene und die Aufklärung über die Rolle spezifischer Gene bei der Prädisposition gegenüber verschiedenen Krankheiten. Um dies zu erreichen, wird die Variabilität in der DNA-Sequenz analysiert, wobei hauptsächlich sogenannte *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) untersucht werden (Sachidanandam et al. 2001). Es existieren mehr als neun Millionen bekannte SNPs in den öffentlichen Datenbanken (Human Genome Structural Variation Working et al. 2007), die meist als Marker für genetische Varianz in Assoziationsstudien zur Erkennung genetischer Ursachen von Krankheiten verwendet werden (Engle et al. 2006). Es sind jedoch funktionelle Tests nötig, um den Einfluss von SNPs auf Struktur- bzw. Funktionsänderungen von DNA, RNA oder Proteinen zu bestimmen.
- (2) Als *Transcriptomics* wird die genomweite Analyse der Genexpression bezeichnet. Nach der vollständigen Sequenzierung des humanen Genoms, kann das resultierende Transkriptom mit ziemlicher Genauigkeit vorhergesagt werden. Die spezifischen mRNA-Transkripte eines biologischen Systems werden analysiert, wobei die mRNA-Abundanz das Expressionsniveau der korrespondierenden Gene reflektiert (Manning et al. 2007). Im Vergleich zur Genotypisierung werden hierbei Parameter, wie spezifische Formen der mRNA und ihre Quantität bestimmt, die Informationen über die Genexpression liefern (Celis et al. 2000). Im Vergleich zum Genom ist das Transkriptom dynamisch und ist abhängig von der Zeit, dem

Zelltyp und unterliegt der Regulation durch extrazelluläre Einflüsse. Die genomweite Expressionsanalyse kann ein umfassendes Bild über aktive Gene zu einem definierten Zeitpunkt in einem biologischen System liefern, wobei diese Vollständigkeit mit keiner der anderen Omics-Technologien erreicht werden kann, da weder das Metabolom, noch das Proteom bekannt sind (Kussmann et al. 2006).

- (3) Unter *Epigenomics* versteht man die Analyse epigenetischer Prozesse im großen Maßstab, meist genomweit (Callinan und Feinberg 2006). Als epigenetische Prozesse werden Mechanismen bezeichnet, die die Aktivität der Gene regulieren, wie Transkription und das *gene-silencing* (Bird 2007, Egger et al. 2004). Zu den am häufigsten untersuchten epigenetischen Modifikationen gehören die DNA-Methylierung und Histonmodifikationen. In den vergangenen Jahren wurden jedoch vermehrt Untersuchungen in Hinblick auf die Genregulation durch kleine, nicht-kodierende RNAs, wie MikroRNAs (miRNAs) durchgeführt.

2.3.3.2 Metabolomics

Als Metabolom werden kleine Moleküle, wie Lipide oder Vitamine bezeichnet, die durch Interaktion mit biologischen Molekülen die Energieübertragung der Zelle (Metabolismus) beeinflussen. Als *Metabolomics* wird folglich die Untersuchung biologischer Proben bezeichnet, die den Stoffwechsel betreffen. Der Vorteil dieser Untersuchungen liegt in der Nutzung leicht zugänglicher biologischer Proben, wie Urin, Speichel oder Plasma. Gleichsam dem Transkriptom, ist das Metabolom hoch variabel. Die Metabolomics-Technologien sollen Aufschluss über die Qualität und Quantität der Metabolite in einem Organismus unter Normalbedingungen und nach Änderung der exogenen Faktoren bringen und werden meist in prä-klinischer und klinischer Forschung, für biomedizinische Anwendungen und in der Toxikologie eingesetzt.

2.3.3.3 Proteomics

Als Proteom wird die Gesamtheit aller Proteine definiert, die in einem Lebewesen/ Gewebe/ Zelle/ Zellkompartiment zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter definierten Bedingungen vorliegen. Im Gegensatz zum Genom ist das Proteom nicht statisch, sondern hoch dynamisch, da es vor allem durch Abbau und Neusynthese von Proteinen einem stetigen Wandel unterliegt. Die Proteinexpression ist gewebespezifisch und hängt vom Entwicklungszustand der Zelle ab.

Weiterhin unterliegt sie spezifischen Regulationsmechanismen und wird von zahlreichen endogenen und exogenen Stimuli beeinflusst (Abb.: 2.2).

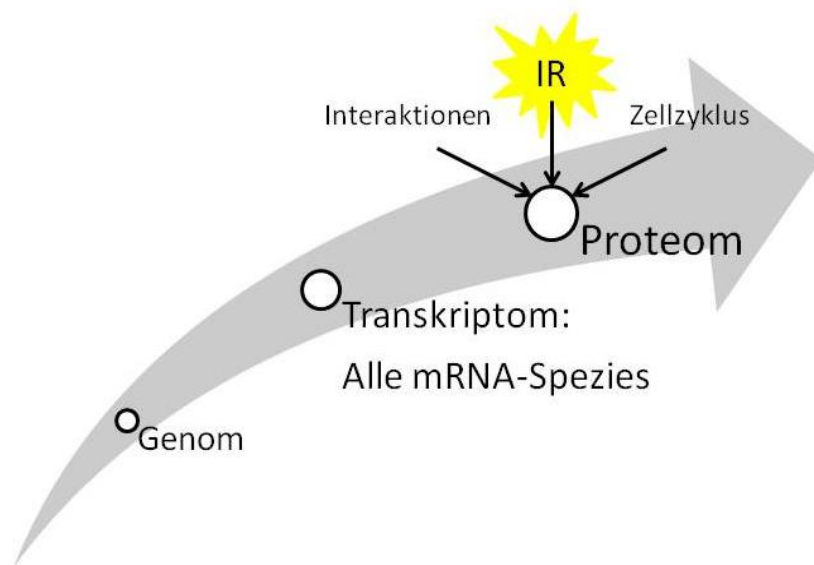


Abbildung 2.2: Das Proteom als dynamisches System. Das Transkriptom beinhaltet alle Ebenen der RNA-Spezies, die an der Transkription und Translation beteiligt sind. Das Proteom ist ein hochdynamisches System: Die Proteinexpression wird durch externe Umweltfaktoren und biologische Faktoren beeinflusst. Somit bildet das Proteom eine Momentaufnahme seiner Umwelt.

Das humane Proteom wird auf eine Größe von mehreren 100.000 Proteinen geschätzt, die durch verschiedene Isoformen eines Proteins noch größer wird. Aus einem einzigen Gen entsteht durch alternatives Spleißen und posttranslationale Modifikation (PTM), wie Acetylierung, Glykosylierung oder Phosphorylierung eine Vielzahl von Proteinisoformen, die sich in ihrer Lokalisation, Funktionalität und Aktivität sehr stark voneinander unterscheiden können. Dies verhindert eine Vorhersage der Proteinabundanz basierend auf Genexpressions-, oder mRNA-Expressions-Studien. Somit umfasst das Proteom die eigentlichen Effektoren der Zelle (Pandey und Mann 2000). Proteomics wird bis heute vornehmlich für die Medikamenten-Entwicklung eingesetzt, da Erkrankungsprozesse und deren Therapie sich meist auf Proteinebene manifestieren. Daher eignet sich die Proteom-Analyse, um diagnostische Marker zu generieren, die auf Veränderungen der Proteinabundanz durch ionisierende Strahlung beruhen.

2.4 Protein Biomarker-Entdeckung

Die wohl größte Herausforderung in der Biomarkersuche auf Proteinebene besteht in der Komplexität des Proteoms. Die Proteinabundanz bestimmter Proteine in einer einzelnen Zelle ist sehr heterogen und reicht von mehreren Millionen Kopien pro Zelle bis zu ein paar wenigen Kopien der niedrig abundanten Proteine, die meist eine größere biologische Relevanz besitzen (Corthals et al. 2000). Deshalb ist es notwendig, Technologien zu verwenden, die die Möglichkeit bieten, robust eine Vielzahl von spezifischen Informationen zu liefern, um valide Ergebnisse zu erzielen.

Es gibt momentan 2 Modelle für den Ansatz der Biomarkersuche. Erstens die Analyse intakter Proteine (*top-down* Proteomics) und zweitens, die Analyse von Peptidgemischen enzymatisch verdauter Proteine (*bottom-up* Proteomics). *Top-down* Proteomics bietet höheren Datendurchsatz, da biologische Präparate direkt gemessen werden, um Unterschiede in der relativen Expression nativer, unverdauter Proteine zu detektieren. Dies bietet die Möglichkeit, basierend auf Unterschieden in der molekularen Masse, zwischen einzelnen Proteinisoformen zu unterscheiden, was durch die *bottom-up* Methode oft nicht erreicht werden kann. Der größte Vorteil der letztgenannten Methode besteht in der Leistungsfähigkeit hoch auflösende Proteinauftrennungen zu erreichen. Darüber hinaus wird eine umfassende Abdeckung aller Proteine innerhalb einer Probe gewährleistet, da die Identifizierung und Expression von hunderten bis tausenden Proteinen möglich ist.

In dieser Arbeit wurde die *bottom-up* Strategie gewählt, um eine Vielzahl von Proteinen des hochkomplexen humanen Proteoms zu detektieren, da eine umfassende Übersicht über die IR-induzierten Veränderungen erreicht werden sollte.

2.5 Pathway-Analyse zur Biomarker-Detektion

Jede der Omics-Technologien bietet aufgrund immer sensitiverer Methoden ein wirksames Werkzeug, um Biomarker zu generieren. Die Analyse und anschließende Interpretation stellt jedoch, aufgrund der enormen Datenmenge, eine große Herausforderung dar. Eine Möglichkeit die generierten Datensätze weiter zu analysieren, besteht in der Nutzung von Softwareprogrammen, die die Ergebnisse biologischen Funktionen und Signalnetzwerken zuordnen. Durch

die Zuordnung deregulierter Proteine in Signalwege können neue Hypothesen generiert werden, welche Proteine potentielle Kandidaten für einen neuen Biomarker darstellen könnten. In dieser Arbeit wurde Ingenuity Pathway Analysis (IPA) für die Netzwerkanalyse verwendet.

2.6 Interindividuelle Strahlenempfindlichkeit in Zelllinien aus Tumorpatienten

Es gibt Hinweise, dass Personen mit Lungenkrebs in jungem Alter (Lung Cancer of the Young, = LUCY) ein instabileres Genom besitzen, als die durchschnittliche Bevölkerung (Mittelstrass et al. 2008, Sauter et al. 2008). Daher soll in diesem Kollektiv geprüft werden, ob unterschiedlich strahlenempfindliche Zelllinien, im Vergleich zu Kontroll-Zelllinien einen deutlichen Unterschied in der Strahlenantwort zeigen. Das Kollektiv der LUCY-Zelllinien ist geeignet, da die Betroffenen ein ähnliches Alter aufweisen (36-50 Jahre) und somit altersabhängige Effekte ausgeschlossen werden können. Darüber hinaus sind die Zelllinien homogen, da die Immortalisierung gleichzeitig durchgeführt wurde und somit die Kultivierungsbedingungen für alle Linien gleich, und die Generationszeiten sehr ähnlich sind.

2.7 Ziel der Arbeit

Da zahlreiche Faktoren und Mechanismen Einfluss auf die individuelle Strahlenempfindlichkeit nehmen, ist nicht zu erwarten, dass für ihre Ermittlung ein einziges Testverfahren ausreichen wird. Um die unterschiedliche zelluläre Reaktion auf ionisierende Strahlung zu analysieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Strahlenantwort unterschiedlich strahlenempfindlicher lymphoblastoider Zelllinien auf Ebene der Effektoren der Zelle analysiert. Hierfür wurde eine Proteom- und miRNA-Analyse durchgeführt, um Einblicke in die intraindividuelle Modellierung der Strahlenantwort zu gewinnen. Individuen mit einer genetisch determinierten Erhöhung der Strahlenempfindlichkeit, wie AT, können als Positivkontrollen zur Erarbeitung von möglichen Parametern verwendet werden. In einer vorhergegangenen Studie wurde eine Genotypisierung spezifischer SNPs durchgeführt, die mit ionisierender Strahlung in Verbindung gebracht werden können, um eventuelle Korrelationen auf Ebene des Genoms feststellen zu können.

Obwohl viele Studien veröffentlicht werden, die neue Biomarker generieren, sind die meisten bis heute existierenden Marker inadequat für die Früherkennung humaner Krankheiten, oder sind nicht sensitiv oder spezifisch genug (Elrick et al. 2006). Oft zeigt sich, dass ein Marker in einem Experiment zur Unterscheidung eines Phänotyps geeignet ist, was in anderen Untersuchungen nicht bestätigt werden kann (Baggerly et al. 2004). Eine Ursache hierfür kann sein, dass die Analyse innerhalb eines Zellsystems intraindividuelle Marker generiert, diese jedoch interindividuell nicht übertragbar sind.

Ziel dieser Arbeit ist, intraindividuelle und interindividuelle Unterschiede auf Proteom- und MikroRNA-Ebene im Hinblick auf die Strahlenantwort zu detektieren und die Expressionsmuster mit dem strahlenempfindlichen Phänotyp zu korrelieren. Gemeinsamkeiten in der Strahlenantwort können wichtige Schlussfolgerungen für weitere Biomarkerstudien bringen.

3. Ergebnis

3.1 Patientenproben der LUCY-Studie

Die LUCY-Studie ist eine bundesweite Studie, an der 31 Krankenhäuser in Deutschland beteiligt waren. LUCY ist die Abkürzung für *Lung Cancer in the Young* und umfasst Betroffene bis zum Alter von 50 Jahren. Betrieben wurde die Studie gemeinschaftlich vom Institut für Epidemiologie des Helmholtz Zentrums München und der Abteilung Genetische Epidemiologie der Universitätsmedizin Göttingen. In der LUCY-Studie wurden Blutproben von 847 Lungenkrebs-Patienten, diagnostiziert im Alter bis 50 Jahren, und 5524 Familienangehörigen gesammelt. Aus den Blutproben wurde zum einen DNA gewonnen und zum anderen wurden durch Immortalisierung mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) lymphoblastoide Zelllinien generiert. Zu Beginn dieser Arbeit waren 120 Proben der 847 Lungenkrebspatienten immortalisiert und wurden am Bundesamt für Strahlenschutz (BfS), Neuherberg verfügbar. Das Bundesamt für Strahlenschutz stellte diese 120 LUCY-Zelllinien für das in dieser Arbeit beschriebene Screening des Zellüberlebens und der metabolischen Aktivität nach Bestrahlung zur Verfügung. Für 92 Zelllinien konnte die Vitalität und Viabilität nach Bestrahlung bestimmt werden. 28 Linien konnten nach dem Auftauen nicht weiter kultiviert werden und wurden von der Analyse ausgeschlossen.

3.2 Etablierung der Versuchsbedingungen für das Screening

Die Kultivierung der 92 zu testenden lymphoblastoiden Zelllinien erwies sich als unproblematisch, da die Wachstumsphasen relativ ähnlich waren und die Generationszeit allgemein zwischen 20 h und 30 h lag. Die Zelllinien befanden sich 5 Tage nach dem Auftauen in der logarithmischen Wachstumsphase und wurden dann für die Bestrahlung ausgesät.

Für die Etablierung eines stabilen Auswahlverfahrens bezüglich der Kategorisierung der Strahlenempfindlichkeit wurde die lymphoblastoide Zelllinie eines strahlensensitiven AT-Patienten GM03189(-) zum Vergleich eingesetzt. Um die Dosis der Bestrahlung und den Zeitpunkt der Analyse festzulegen, wurde eine Dosis-Effekt-Kurve mit Hilfe der Linie GM03189(-) generiert

und 24 h bzw. 48 h post-Bestrahlung eine Vitalitätsbestimmung durch den Trypanblautest durchgeführt. Die Dosis-Effekt-Kurve aus zwei unabhängigen Versuchen ist in Abbildung 3.1 dargestellt und beschreibt den Grad des Überlebens in Abhängigkeit von der applizierten Dosis.

Um den Vitalitätsverlust zu beobachten, wurden für die weitere Etablierung des Screening-Verfahrens zwei unterschiedliche Bestrahlungsdosen gewählt. 4 Gy und 10 Gy erwiesen sich als gut, um zu den frühen Zeitpunkten 24 h und 48 h nach Bestrahlung die Vitalität zu bestimmen.

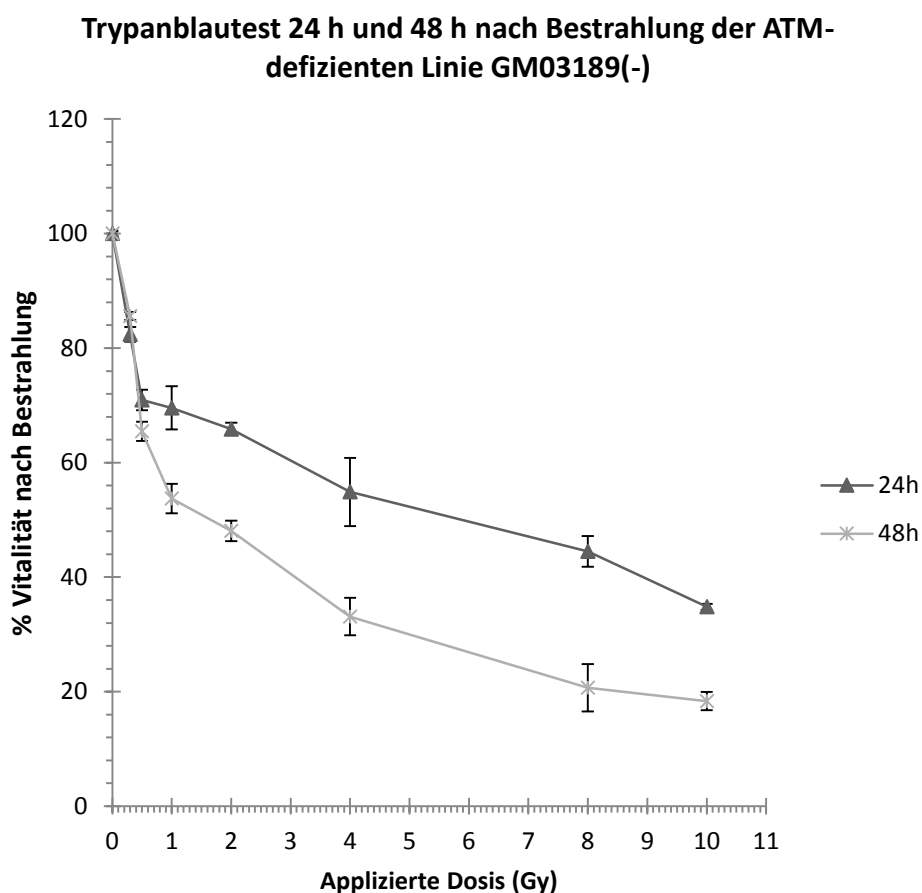


Abbildung 3.1: Dosis-Effekt-Kurve der sensitiven, ATM-defizienten Linie GM03189(-) 24 h und 48 h post-Bestrahlung (0,3 Gy, 0,5 Gy, 1 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 8 Gy und 10 Gy)

In der Abbildung sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 2 unabhängigen Bestrahlungsexperimenten dargestellt.

Die Linie GM03323(+) des Bruders des AT-Patienten, der keine Mutation im ATM-Gen besitzt, erwies sich in den Vorversuchen als strahlenunempfindlich und wurde ebenfalls als Kontrolllinie für normale Empfindlichkeit verwendet. Es folgten unabhängige Bestrahlungsversuche mit den

Linien GM03189(-) und GM03323(+) zur Etablierung der Dosis und der eingesetzten Zellzahl, bei der die unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit stabil messbar ist. Abbildung 3.2 zeigt das Zellüberleben 24 h nach Bestrahlung mit 4 Gy bzw. 10 Gy.

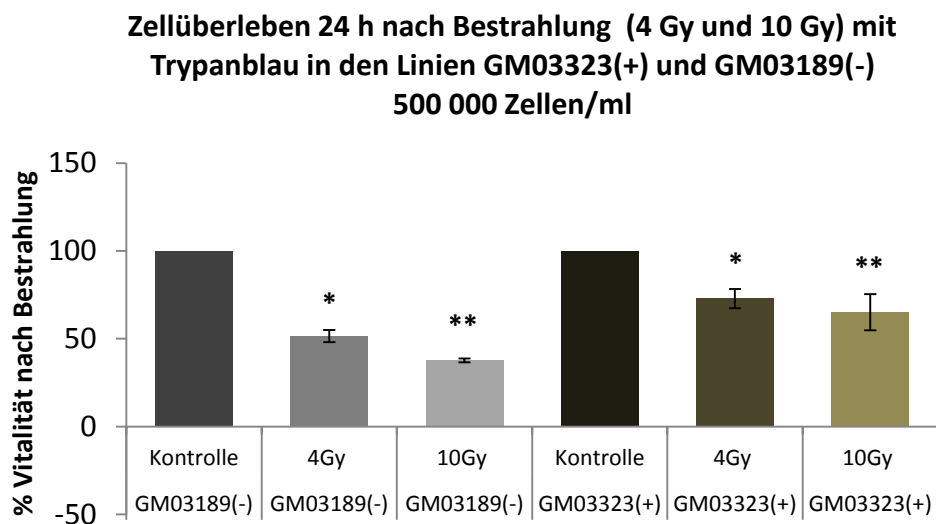


Abbildung 3.2: Vitalitätstest mit Hilfe der Trypanblau-Vitalfärbung 24 h post-Bestrahlung mit 4 Gy bzw. 10 Gy bei einer Zellzahl von 500.000 Zellen/ml. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 2 unabhängigen Experimenten. Der Vitalitätsverlust war bei beiden Dosen signifikant (*p-Wert < 0,05; **p-Wert < 0,01).

4 h nach Bestrahlung war der Vitalitätsverlust in der sensitiven Linie GM03189(-) mit einem p-Wert 0,03 signifikant, bei der hohen Dosis ist dies mit einem p-Wert 0,009 noch deutlicher zu erkennen. Die normal reagierende Linie GM03323(+) zeigt ebenfalls bei beiden Dosen einen signifikanten Vitalitätsverlust, mit einem p-Wert 0,02 nach 4 h und 0,004 nach 24 h.

Die Zellkonzentration von 500.000 Zellen/ml zum Zeitpunkt 0 h bei einer Bestrahlung mit 10 Gy erwies sich als geeignet für die Messungen, da hier der Unterschied zwischen der sensitiven Linie GM03189(-) und der normalen Linie GM03323(+) mit einem p-Wert 0,01 signifikant ist.

3.2.1 Screening des Überlebens lymphoblastoider Zelllinien nach Bestrahlung

Um unterschiedlich strahlenempfindliche Zelllinien zu identifizieren, wurde das Zellüberleben zu zwei Zeitpunkten (24 h und 48 h) nach Bestrahlung mit 10 Gy (^{137}Cs -Quelle) in 92 lymphoblastoiden Zelllinien der LUCY-Studie bestimmt. Hierfür wurde neben der Trypanblau-Vitalfärbung der WST- 1 Test verwendet, der die Möglichkeit bietet, die Viabilität einer Vielzahl von Zelllinien in Mikrotiterplatten zu bestimmen. Das Ergebnis des WST- 1 Tests bezüglich der Viabilität nach Bestrahlung für alle getesteten LUCY-Zelllinien ist im Anhang in Tabelle 1 aufgeführt.

Fünf Zelllinien (20038, 4040, 4039, 4028 und 4060) zeigen in beiden Testverfahren einen strahlensensitiven Phänotyp, der mit der Überlebensrate der Linie GM03189(-) vergleichbar war. Um die Strahlenempfindlichkeit reproduzierbar zu validieren, wurden 18 LUCY-Linien (4008, 4028, 4039, 4040a, 4060, 4064, 4119, 4120, 5003, 7005, 8001, 20037, 20038, 20045, 29025, 32004, 33001 und 36011), sowie die Kontrolllinien nach Verblindung an das ISB des Helmholtz Zentrum München gegeben, wo die Bestrahlungsversuche in einem unabhängigen Experiment durchgeführt wurden und die Vitalität post-Bestrahlung durch den Trypanblautest bestimmt wurde.

Um die Empfindlichkeit der Zelllinien nach Exposition mit ionisierender Strahlung zu beurteilen, wurde mit den Überlebensdaten nach Trypanblaufärbung der p-Wert mit dem Student's t-Test ermittelt. Es ist bekannt, dass ATM-defiziente Zelllinien eine Hypersensitivität gegenüber Strahlung aufweisen. Wird der p-Wert mittels des Student's t-Test aus den beiden Kontrolllinien berechnet, ist die ATM(-)-Linie signifikant empfindlicher als die ATM(+)-Linie. Um strahlenempfindliche, lymphoblastoide Klone aus dem LUCY-Kollektiv zu ermitteln, wurde die Überlebensrate der getesteten Zelllinien, sowie der hypersensitiven Kontrolllinie (GM03189(-)) gegen die Überlebensrate der ATM(+)-Kontrolllinie (GM03323(+)) gerechnet. Die Ergebnisse wurden als hoch signifikant (**) bewertet, wenn zu beiden Zeitpunkten der p-Wert $< 0,01$ war und mindestens 3 unabhängige Messungen durchgeführt wurden. In Tabelle 3.1 sind die p-Werte der getesteten Zelllinien 24 h und 48 h nach Bestrahlung mit 10 Gy aufgeführt. Die signifikant sensiblen Linien sind am Tabellenanfang nach absteigendem p-Wert aufgelistet. Die übrigen Linien sind nach absteigender Nummer geordnet.

Mit dem Trypanblau-Experiment wurden am Helmholtz-Zentrum dieselben 5 Linien als sensitiv bewertet, die zuvor von mir durch WST- 1 und Trypanblau bestimmt wurden.

Tabelle 3.1: Statistische Signifikanz der experimentell evaluierten Daten für Strahlenempfindlichkeit nach Trypanblau-Färbung. Die Tabelle zeigt die p-Werte (Student's t-Test) der Trypanblaufärbung 24 h und 48 h nach Bestrahlung mit 10 Gy. Als Referenz wurde das prozentuale Überleben der Kontrolllinie GM03323(+) verwendet. Am Anfang der Tabelle sind die strahlenempfindlichen Zelllinien mit absteigendem p-Wert aufgelistet.

Zelllinie	p-Wert 24 h	p-Wert 48 h	Messungen
GM03189(-)**	0,002	0,004	3
20038**	0,001	0,004	3
4040**	0,002	0,005	3
4039**	0,002	0,005	4
4028**	0,003	0,009	4
4060**	0,006	0,005	3
36011	0,031	0,018	2
33001	0,709	0,983	2
32004	0,402	0,531	2
29025	0,201	0,249	2
20045	0,882	0,630	2
20037	0,609	0,526	2
8001	0,088	0,122	2
7005	0,041	0,122	2
5003	0,031	0,133	2
4120	0,044	0,030	2
4119	0,081	0,070	2
4064	0,239	0,112	2
4008	0,008	0,012	2

Das Ergebnis des Trypanblautests der zwei Laboratorien, für die fünf sensitiven Linien, ist in Tabelle 3.2 gezeigt.

Tabelle 3.2: Übersicht über das Zellüberleben der fünf strahlensensitiven LUCY-Zelllinien mit WST-1 und Trypanblau nach Bestrahlung mit 10 Gy. Die Tabelle zeigt die Ergebnisse des Trypanblautests aus zwei Laboratorien und unabhängigen Experimenten.

Zelllinie	Labor 1				Labor 2	
	%	%	%	%	%	%
	Überleben nach 24 h (WST-1)	Überleben nach 48 h (WST-1)	Überleben nach 24 h (Tryp.blau)	Überleben nach 48 h (Tryp.blau)	Überleben nach 24 h (Tryp.blau)	Überleben nach 48 h (Tryp.blau)
Kontrolle^a						
GM03189-	40.5+4.2	30.2+3.8	46.4+2.7	33.6+2.4		
GM03323+	68.3+7.4	59.6+8.1	76.1+6.2	62.1+7.3		
LUCY						
20038	44.6	35.3	45.5	35.5	42.1	33.3
4040	38.4	23.7	46.6	28.9	36.1	21.3
4039	33.5	23.3	31.7	21.1	50.0	42.3
4028	50.1	36.2	54.2	39.5	47.5	32.5
4060	47.7	27.4	35.7	24.4	40.6	23.8

^aDaten für die Zelllinien GM03189(-) und GM03323(+) zeigen den Mittelwert und Standardabweichung fünf unabhängiger Experimente.

Die fünf Zelllinien (20038, 4040, 4039, 4028 und 4060), die in beiden Testverfahren einen strahlensensitiven Phänotyp zeigten, der mit der Überlebensrate von GM03189(-) vergleichbar ist und einen signifikanten P-Wert < 0,01 besitzen, wurden für weitere Experimente ausgewählt. Desweiteren wurde die Zelllinie 20037 mitgeführt, deren Viabilität und Vitalität nach Bestrahlung ähnlich der der Kontrolllinie war.

Für die weiteren Analysen wurde zudem eine dritte Kontrolllinie mitgeführt, die eine durchschnittliche Empfindlichkeit gegenüber Strahlung aufweist und als normal reagierende humane Kontrolle verwendet wurde (HuKo).

Am ISB des Helmholtz Zentrum München wurde die Strahlenantwort von neun unterschiedlich empfindlichen LUCY-Zelllinien (4008, 4028, 4039, 4040, 4060, 4064, 20037, 20038 und 36011) mit verschiedenen Methoden funktionell charakterisiert. Die strahleninduzierte Apoptose wurde anhand der SubG1-Population und der Caspase-3 Aktivität gemessen. Die fünf strahlensensitiven Linien zeigten sowohl eine erhöhte Menge an SubG1-DNA, als auch eine erhöhte Caspase-3 Aktivität nach Bestrahlung mit 10 Gy, im Vergleich zur normalen Kontrolle GM03323(+). Darüber hinaus wurde der relative Anteil der Zellen an der G₂/M-Phase 24 h post-Bestrahlung mit 10 Gy ermittelt, wobei die sensitiven Linien einen stärkeren Arrest nach Bestrahlung zeigen. Die DNA-Reparaturkapazität wurde anhand der γH2AX Foci 4 h und 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy bestimmt. Die sensitiven Linien zeigen einen höheren Restschaden als die Kontrolle GM03323(+).

In allen untersuchten Endpunkten sind die gemessenen Daten der Linie 20037 ähnlich der strahlenunempfindlichen Kontrolle GM03323(+), wodurch diese als normal reagierend einzuordnen ist (Krämer und Mörtl, persönliche Mitteilung). Die radiosensitiven Zelllinien zeigten eine deutlichere und länger anhaltende H4K16 Hypo-Acetylierung als die unempfindlichen Linien. Diese Beobachtung korreliert mit der Beobachtung des höheren Restschadens (γ H2AX Foci) 24 h nach Bestrahlung (Maroschik et al. 2014).

Die Ergebnisse der unterschiedlichen Methoden zur Messung der Radiosensitivität bestätigen die Daten des Zellüberlebens. Die sensitiv und die unempfindlich reagierenden Linien besitzen einen stabilen Phänotyp nach Exposition mit ionisierender Strahlung und sind somit für weiterführende Analysen geeignet. Spezifisch wurden hierfür die LUCY-Linien 20037 und 4060 ausgewählt, da sie die extremsten, hier gemessenen Phänotypen zeigen. Die LUCY-Linie 20037 ist phänotypisch nach Bestrahlung resistenter als die Kontrolllinie GM03323(+), und die Linie 4060 sensitiver als die Linie GM03189(-).

3.3 Karyotypisierung der unterschiedlich strahlenempfindlichen Zelllinien

Um die zytogenetische Konstitution der verwendeten Zelllinien zu ermitteln, wurde die multicolorFISH-Analyse (mFISH) genutzt. Es sollte erfasst werden, ob und wie weit die Karyotypen vom normalen Karyotyp 46,XX/46,XY abweichen, da in der Literatur beschrieben ist, dass LCLs nach mehreren Generationszeiten genomisch instabil werden. Für die Karyotypendarstellung der lymphoblastoiden Zelllinien wurden Metaphasepräparate der, für die Proteomanalyse langfristig kultivierten Zelllinien ausgewertet. Die Linie 4060 zeigt einen ursprünglichen, weiblichen Karyotyp mit 46,XX. Die Karyogramme der Linien 20037, sowie die Kontrolllinien HuKo und GM03189(-) zeigen Veränderungen in den Karyogrammen auf. Für die Karyotypisierung der Linie 20037 wurden 171 Metaphasen ausgewertet. 27 Metaphasen zeigten ein verändertes Chromosom 10, das sich durch einen Zugewinn an genetischem Material von Chromosom 18 auszeichnet (46,XX,der(10)add(18)). 7 Metaphasen zeigen einen normalen Karyotyp 46,XX mit einem dizentrischen Chromosom aus Chromosomen 6 und 7 (46, XX, dic(6; 7)). 5 Metaphasen besitzen den Karyotyp 46XX,der(7)add(15), 4 Metaphasen 46XX, dic(7; 8), während 128 Karyogramme den normalen Karyotyp 46,XX zeigen. Für die Linie HuKo wurden 68 Metaphasen analysiert. Der Karyotyp setzt sich zusammen aus 25 Metaphasen mit 46,XY,der(19)add(13), 12 Metaphasen

besitzen ein zusätzliches Chromosom 8 (47,XY+8), 4 Metaphasen zeigen den Karyotyp 46,XY,der(19)add(11) und 8 Metaphasen den unveränderten Typ 46,XY. Von 99 analysierten Metaphasen der Linie GM03189(-) zeigen 92 den normalen Karyotyp 46,XY. 5 Metaphasen besitzen den Typ 46,XY,der(22)add(20) und 2 Metaphasen zeigen 46,XY,der(22)add(3). Die Kontrolllinie GM03323(+) besitzt einen nahezu unveränderten Karyotyp mit 99 Metaphasen 46,XY und einem Verlust von Chromosom 19 in 3 Metaphasen. Die Karyotypen der hier, aufgrund der unterschiedlichen Empfindlichkeit weiter analysierten Zelllinien und beispielhafte Karyogramme sind in Abbildung 1 und Tabelle 2 im Anhang aufgeführt.

3.4 Proteomanalyse zur Identifizierung deregulierter Proteine der Strahlenantwort in LCLs

Proteine sind die wichtigsten Regulatoren in der Strahlenantwort. Um Proteine zu identifizieren, die nach gamma-Bestrahlung differentiell exprimiert sind, wurden die fünf unterschiedlich strahlenempfindlichen Zelllinien kultiviert (Tabelle 3.3) und es wurden 0,5 h, 4 h und 24 h nach Bestrahlung mit 1 Gy bzw. 10 Gy Gesamtzellextrakte hergestellt, die mit Hilfe der hochauflösenden 2D-DIGE™-Technik analysiert wurden.

Tabelle 3.3: Unterschiedlich empfindliche Zelllinien, die mit der 2D-DIGE™-Technik analysiert wurden.

Zelllinie	Strahlenempfindlichkeit
Kontrolle	
HuKo	normal
GM03323(+)	normal
GM03189(-)	sensitiv
LUCY	
4060	sensitiv
20037	normal

Es wurden jeweils 2 biologische Replikate, die zeitlich unabhängig nacheinander aufgetaut und kultiviert wurden und 2 technische Replikate analysiert, wobei für die technischen Replikate ein sog. *dye-swap* durchgeführt wurde. Hierzu werden die Proben, die im ersten Durchlauf Cy3 markiert wurden Cy5 markiert und andersherum. Der *dye-swap* wird verwendet, da sich ca. 3 % der Proteine besser mit einem der beiden Farbstoffe (Cy3/Cy5) markieren lassen. Durch das

reziproke Markieren kann dieser Effekt ausgeschlossen werden. Dies schließt falsch-positive Regulationen aus, die durch eine quantitativ unterschiedliche Markierung entstehen. Um die technischen mit den biologischen Replikaten zu vergleichen, wurden alle Gele gepoolt und analysiert. Die Proteinmuster wurden aufeinander abgestimmt, und die Regulationen der einzelnen Spots analysiert. Spots, mit einem signifikanten p-Wert (T-Test) < 0.05 , wurden als sog. „*protein of interest*“ (POI) markiert und mit einer *Master-ID* (Spot-Nummer) versehen. Regulierte Spots, die eine Master-ID besitzen, sind somit in allen Replikaten signifikant reguliert. Der T-Test wird über die Graustufen im Bild ermittelt. Spots, deren Graustufen in einer Gruppe (z.B. 10 Gy, 4 h) innerhalb der zugelassenen statistischen Grenzwerte übereinstimmen und die sich stark von übereinstimmenden Graustufen der zugehörigen Kontroll-Spots (0 Gy, 4 h) unterscheiden, werden von der Software als statistisch signifikant gewertet. Darüber hinaus wurde die Varianz zwischen den zu vergleichenden Spots auf unterschiedlichen Gelen durch Berechnung der ANOVA (*Analysis of variance*) mit einer statistischen Signifikanz $p < 0,05$ bestimmt und die zu analysierenden Spots mussten in $> 75\%$ der inter-Gel-Spotmuster vorhanden sein. Das durch die POI-Markierungen erstellte Master-Gel diente als Matrize für die Analyse der biologischen Replikate. Die technischen Replikate wurden von der Analyse ausgeschlossen, um die Statistik nicht zu „beschönigen“ und die Regulationsfaktoren der rein biologischen Replikate zu erfassen. Die Regulationsfaktoren werden bestimmt, indem die Mittelwerte der Graustufen bestrahlter Spots mit den Mittelwerten der Graustufen zugehöriger unbestrahlter Spots mathematisch verglichen werden. Der angegebene Regulationsfaktor bezieht sich demnach auf den Mittelwert der Regulationsfaktoren aus 2 biologischen Replikaten.

Die Auftrennung der Proteine in der ersten Dimension erfolgte über eine Länge von 17 cm und einem nicht-linearen pH-Bereich 3-10. Die Auftrennung nach Größe erfolgte über ein 12,5 % SDS-Gel. Dies ermöglicht die Analyse eines großen Proteinbereichs von bis zu 5000 Spots pro Gel. Die Unterschiede in der Expression wurden gegen die jeweils unbestrahlte Linie verglichen.

3.4.1 Hochauflösende Gele für die 2D-Gelelektrophorese

Die Verwendung hochauflösender, großer Gele in Kombination mit direkt fluoreszenzmarkierten Proteinen zeigte eine sehr gute Auflösung und resultierte in der Detektierbarkeit von 2.300 – 3.500 Spots pro Gel. Ein beispielhaftes DIGE-Gel ist in Abbildung 3.3 dargestellt.

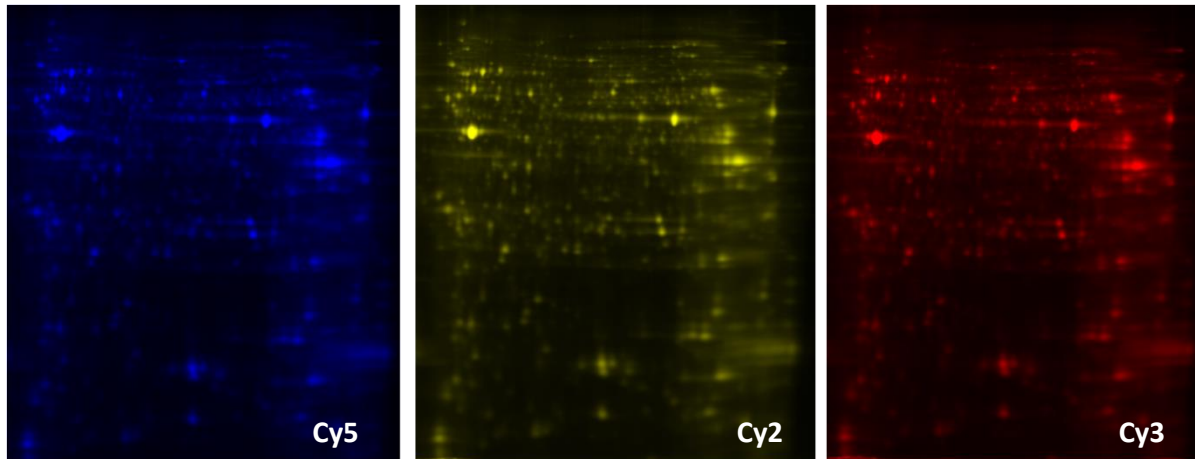


Abbildung 3.3: Repräsentatives 2D-Gel der Linie 4060. Die Abbildung zeigt die Scan-Bilder der mit 3 Cyanin-Fluoreszenzfarbstoffen unterschiedlich markierten Proteinextrakte (Cy3, Cy2 und Cy5). In diesem Gel sind 3100 Spots detektierbar. Die Bilder zeigen deutlich, dass die Migration der Proteine im Gel für alle 3 Extrakte identisch verlaufen ist.

3.4.2 Ergebnisse der differentiellen Analyse

Die Analyse der differentiell exprimierten Spots erfolgte zunächst für jede Zelllinie einzeln. Spots mit einem p-Wert von $< 0,05$ (ANOVA) und einem Regulationsfaktor von 1,1 oder mehr ($\leq -1,1$ oder $\geq 1,1$), wurden als signifikant verändert bewertet. In der Strahlenbiologie ist ein *cut-off* bei einer Deregulation $\leq -1,3$ oder $\geq 1,3$ gebräuchlich. Die von mir gemessenen Regulationsfaktoren in den lymphoblastoiden Zelllinien sind vergleichsweise sehr gering, wodurch kaum Proteine eine $> 30\%$ Regulation aufweisen. Da eine spätere Validierung von Proteinen mit nur $\sim 10\%$ Regulation möglich ist, wurden auch solche Proteine in die Analyse mit einbezogen. Laut Hersteller (GE Healthcare) ist die DIGE-Methode geeignet, diese geringen Regulationen signifikant zu detektieren. Dies wurde bereits in der Literatur bestätigt. Die Autoren geben an, einen Expressionsunterschied von 10% mit einer statistischen Sicherheit von 95% ($p < 0,05$) messen zu können (Knowles et al. 2003).

Alle Spots wurden während der Bildanalyse manuell kontrolliert, um zu verhindern, dass die Veränderungen auf Artefakte, wie zum Beispiel Staub, zurückzuführen sind. Um die veränderten Spots aus dem Gel auszusteichen und zu identifizieren, wurden die Gele zuerst mit *Flamingo Fluorescent Stain* (BioRad) nachgefärbt und anschließend durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Die Spots wurden mit einem Trypsinverdau für die MALDI-TOF/MS-Analyse vorbereitet (6.5.2). Nach der massenspektrometrischen Analyse wurden die aus den zugehörigen Spots signifikant identifizierten Proteine in der Software den Master-Spots zugeordnet (Abb.: 3.4). Die Identifizierung der Proteine mittels MALDI-TOF/MS war signifikant, wenn der Mascot-Score > 63 betrug (6.5.2.1).

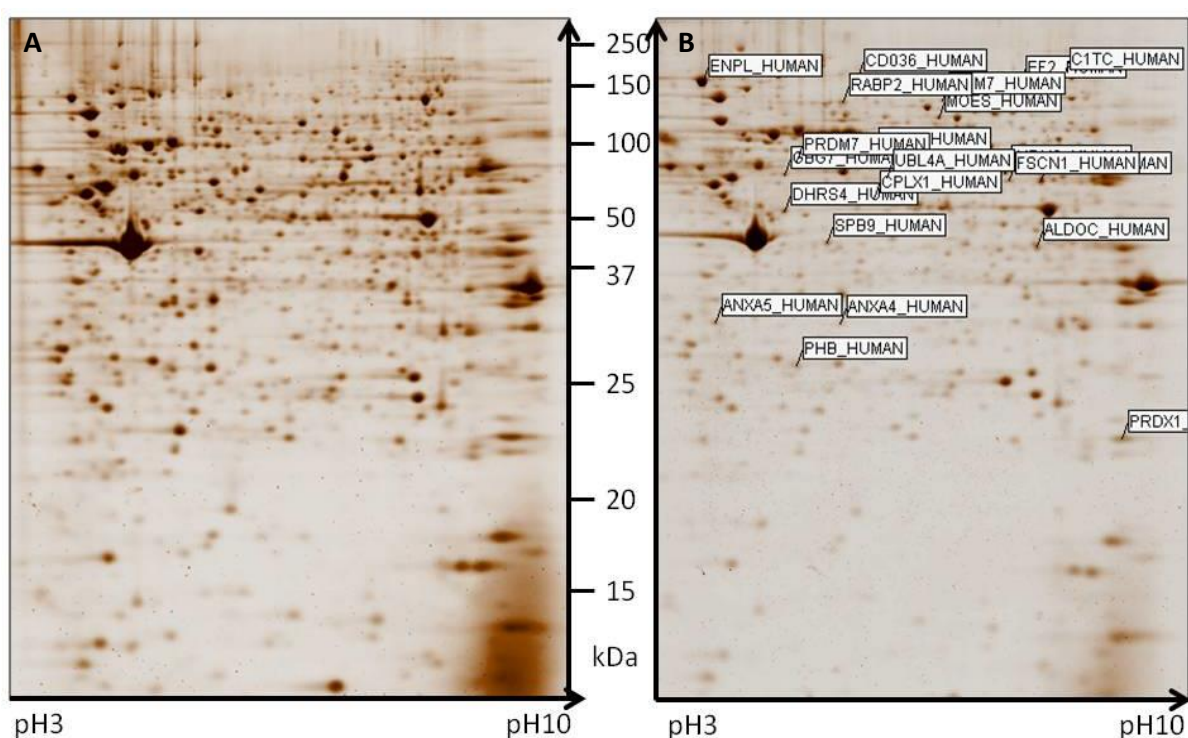


Abbildung 3.4: Coomassie gefärbtes 2D-Gel. A zeigt die gute Auflösung und Visualisierung der Spots nach Fluoreszenz- und anschließender Coomassie-Färbung. B zeigt die identifizierten Proteine, die den zugehörigen Spots zugeordnet sind.

In Tabelle 3.4 ist die Anzahl unterschiedlich exprimierter Spots nach Analyse mit der Decyder-Software und die Anzahl identifizierter Proteine nach MALDI-TOF/MS aufgeführt. Nach Bestrahlung mit 1 Gy wurden ~ 74 % der Spots signifikant durch die MALDI-TOF/MS Analyse identifiziert. Bei der Analyse nach Bestrahlung mit 10 Gy wurden ~ 77 % der Proteine erfolgreich identifiziert. Die deregulierten Proteine sind im Anhang in den Tabellen 3 A-F gezeigt. Während der Mascot-Analyse werden ebenfalls Proteine mit einem Wert < 63 erfasst, aber hier in der

weiteren Auswertung nicht berücksichtigt. Für die eindeutige Identifizierung dieser Proteine müsste eine Validierung mit einem spezifischen Antikörper, oder eine weitere MALDI-Analyse erfolgen.

Tabelle 3.4: Anzahl der Spots, die signifikant reguliert waren (Decyder) und der daraus mittels MALDI-TOF/MS identifizieren Proteine (MALDI).

	1 Gy	1 Gy	%	10 Gy	10 Gy	%
Zelllinie	Decyder	MALDI		Decyder	MALDI	
HuKo	24	18	75	35	24	68,6
GM03323(+)	24	13	54,2	32	25	78,1
GM03189(-)	29	22	75,9	32	24	75
4060	37	28	75,7	45	32	71,1
20037	32	27	84,4	50	44	88

3.4.3 Vergleich der differentiell exprimierten Proteine innerhalb einer Zelllinie zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit 1 Gy und 10 Gy

Um einen Überblick zu gewinnen, wie viele Proteine sich innerhalb einer Zelllinie über die 3 gewählten Zeitpunkte verändern (Regulation > 10 %), bzw. zu allen 3 Zeitpunkten als differentiell exprimiert verbleiben, wurden Venn-Diagramme angefertigt, die die Anzahl der sich überschneidenden und einzeln vorliegenden Proteine zeigen (Abbildung 3.5 A-E). Die Anzahl der Proteine, die nur zu einem Zeitpunkt als dereguliert beobachtet wurden, sind in den Kreisen eingetragen (0,5 h = grün; 4 h = helles violett; 24 h = hellblau). Die Anzahl gemeinsamer Proteine zwischen 0,5 h/4 h sind in der braunen, gemeinsame Proteine zwischen 0,5 h/24 h in der dunkelblauen und gemeinsame Proteine zwischen 4 h/24 h in der violetten Schnittmenge gezeigt. Die über alle 3 Zeitpunkte differentiell exprimierten Proteine sind in der weissen Schnittmenge dargestellt.

Die zugehörigen Proteine sind mit dem Gennamen in den Tabellen 3.5-3.14 aufgelistet. Namen, die in den Tabellen fett markiert sind, besitzen eine Regulation > 30 %. Kursiv dargestellt sind Proteine, die intraindividuell hochreguliert wurden, während herunterregulierte Proteine in

normalem Schrifttyp dargestellt sind. Sind die Proteine zu zwei Zeitpunkten gegensätzlich reguliert, sind diese unterstrichen.

Um die interindividuellen Gemeinsamkeiten darzustellen, sind die betroffenen Proteine farbig hinterlegt. In der Tabelle rot markierte Gennamen sind in der jeweiligen Zelllinie hochreguliert, grün hinterlegte Gennamen stehen für interindividuell herunterregulierte Proteine.

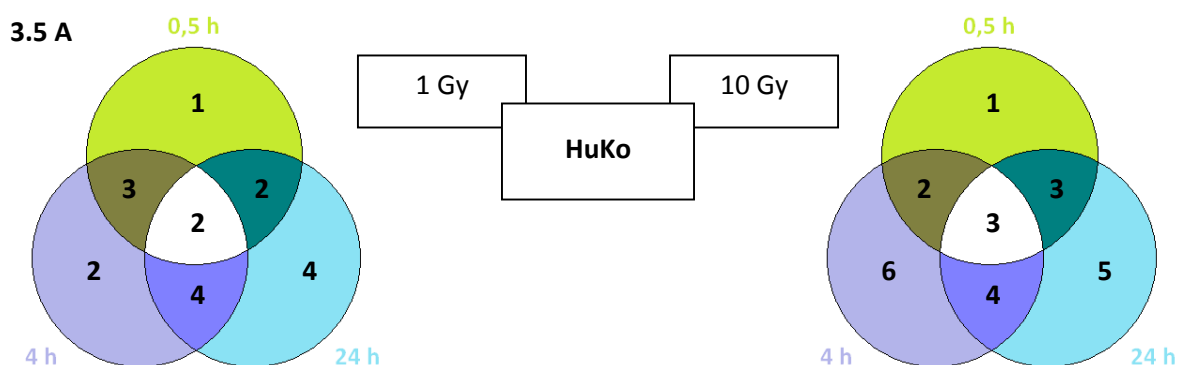


Abbildung 3.5 A: Venn-Diagramme, von allen differentiell exprimierten Proteinen 0,5 h, 4 h und 24 h nach Bestrahlung mit 1 Gy und 10 Gy in der Zelllinie HuKo. Die Diagramme zeigen die Anzahl der unterschiedlich exprimierten Proteine nach 0,5 h (grün), 4 h (lila) und 24 h (hellblau) nach Bestrahlung mit 1 Gy und 10 Gy. Die Schnittmenge (weisser Bereich) umfasst alle Proteine, die zu allen 3 Zeitpunkten signifikant verändert sind.

Tabelle 3.5-3.14: Die Proteine sind mit den zugehörigen Gennamen aufgeführt. Die fett dargestellten Proteine haben einen Regulationsfaktor > 30 %. Die kursiv dargestellten Proteine sind intraindividuell hochreguliert. Die unterstrichenen Proteine sind zu den Zeitpunkten gegensätzlich reguliert. Grün hinterlegte Proteine sind interindividuell (in min 2 Zelllinien) herunter-, rot hinterlegte Proteine sind interindividuell hochreguliert.

Tabelle 3.5: Differentiell exprimierte Proteine der Zelllinie HuKo nach Bestrahlung mit 1 Gy.

Zeitpunkte nach Bestrahlung mit 1 Gy	Zeitpunkte nach Bestrahlung mit 1 Gy			
		0,5 h	4 h	24 h
	0,5 h	<i>CFL1</i>	<i>PPIA</i> , <i>SHROOM3</i> , <i>ATP6V1B2</i>	<i>HSP90AB1</i> , <u><i>PGAM</i></u> ,
	4 h	<i>PPIA</i> , <i>SHROOM3</i> , <i>ATP6V1B2</i>	<i>ATP5B</i> , <i>PRDX1</i> ,	<i>HNRNPH1</i> , <i>HNRNPK</i> , <u><i>LCP1</i></u> , <i>NDUFS1</i>
	24 h	<i>ACTB</i> , 9606(NCBI)		<i>ACO2</i> , <i>ALB</i> , <i>IMMT</i> , <i>LRPPRC</i>

Tabelle 3.6: Differenziell exprimierte Proteine der Zelllinie HuKo nach Bestrahlung mit 10 Gy.

Zeitpunkte nach Bestrahlung mit 10 Gy	Zeitpunkte nach Bestrahlung mit 10 Gy			
		0,5 h	4 h	24 h
	0,5 h	PDIA6	LDHA, PFKP ,	ACTB , CSK , XRCC5
	4 h		ANXA11 , DPYSL2, FKBP4, <i>GDI2</i> , IMPDH2, MSH2	LCP1, MX1 , <i>PDLIM1</i> , STARD8
	24 h	CORO7, DDB1 , HSPD1		CAP1, DLD, EHD1 , PA2G4, <i>SERPINB9</i>

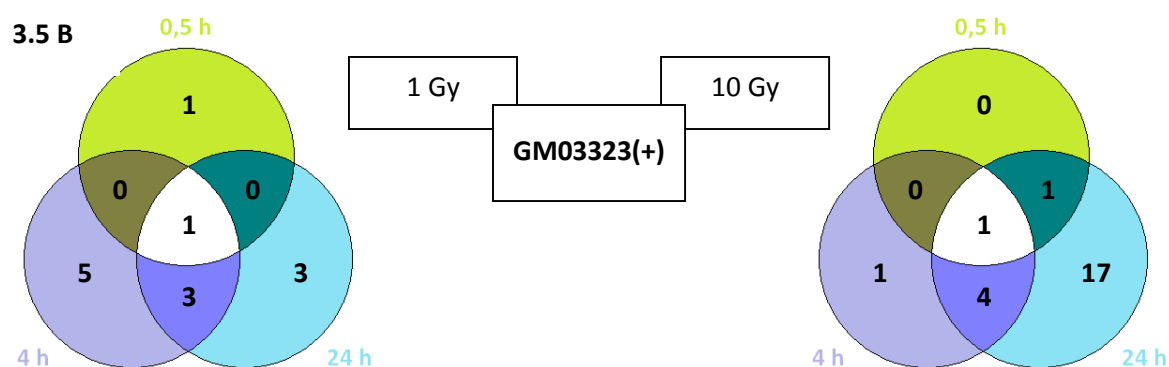


Abbildung 3.5 B: Venn-Diagramme, von allen differenziell exprimierten Proteinen 0,5 h, 4 h und 24 h nach Bestrahlung mit 1 Gy und 10 Gy in der Zelllinie GM03323(+). Die Diagramme zeigen die Anzahl der unterschiedlich exprimierten Proteine nach 0,5 h (grün), 4 h (lila) und 24 h (hellblau) nach Bestrahlung mit 1 Gy und 10 Gy. Die Schnittmenge (weisser Bereich) umfasst alle Proteine, die zu allen 3 Zeitpunkten signifikant verändert sind.

Tabelle 3.7: Differenziell exprimierte Proteine der Zelllinie GM03323(+) nach Bestrahlung mit 1 Gy.

Zeitpunkte nach Bestrahlung mit 1 Gy	Zeitpunkte nach Bestrahlung mit 1 Gy			
		0,5 h	4 h	24 h
	0,5 h	PPP2CB	---	---
	4 h	---	ACO1, ALB , NAMT, UBE2I, XRCC6	ENO1 , HNRNPH1 , OGDH
	24 h	ACTG1		MX1, EZR, STAT1

Tabelle 3.8: Differentiell exprimierte Proteine der Zelllinie GM03323(+) nach Bestrahlung mit 10 Gy.

Zeitpunkte nach Bestrahlung mit 10 Gy	Zeitpunkte nach Bestrahlung mit 10 Gy			
		0,5 h	4 h	24 h
	0,5 h	---	---	MX1
	4 h	---	LMNA	ACTB , ARHGDI4, <u>CORO1C</u> , SERPB1
	24 h	RABGAP1L		ACTG1 , ANXA4 , ATP5A1, EEF2 , GANAB, GDI2, HNRNPH1 , HNRNPU , HSP90B1 , HSPA5 , LDHB , MCM7, P4HB , PDIA3 , PDIA6 , PHGDH, PRKAR1A, UQCRC1,

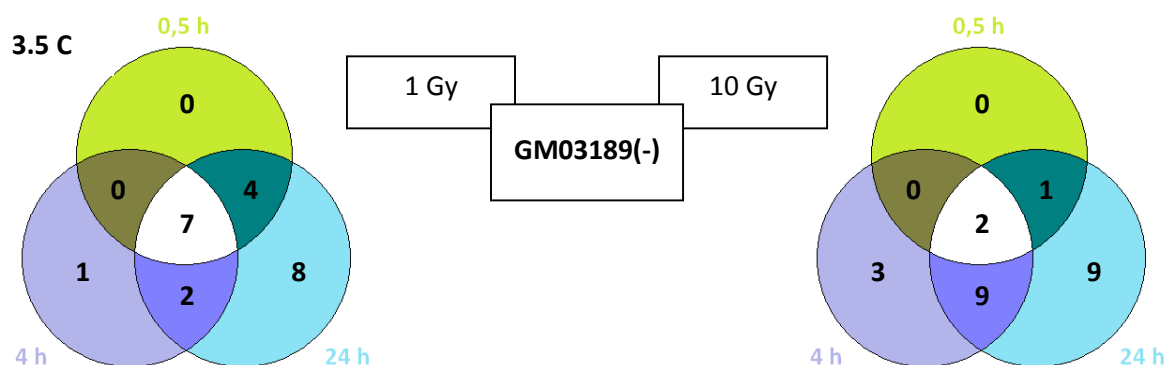


Abbildung 3.5 C: Venn-Diagramme, von allen differentiell exprimierten Proteinen 0,5 h, 4 h und 24 h nach Bestrahlung mit 1 Gy und 10 Gy in der Zelllinie GM03189(-). Die Diagramme zeigen die Anzahl der unterschiedlich exprimierten Proteine nach 0,5 h (grün), 4 h (lila) und 24 h (hellblau) nach Bestrahlung mit 1 Gy und 10 Gy. Die Schnittmenge (weisser Bereich) umfasst alle Proteine, die zu allen 3 Zeitpunkten signifikant verändert sind.

Tabelle 3.9: Differentiell exprimierte Proteine der Zelllinie GM03189(-) nach Bestrahlung mit 1 Gy.

Zeitpunkte nach Bestrahlung mit 1 Gy	Zeitpunkte nach Bestrahlung mit 1 Gy			
		0,5 h	4 h	24 h
	0,5 h	---	---	ENO1, LCP1, PHB, PSMC6
	4 h	---	RPSA	LMNB1, VIP
	24 h	ACTG1, ALB, EEF2, ERO1L, GAPDH, MAP2, NDUFS1		ANXA6, ARHGDI1, CORO1A, EIF4A1, HSPH1, LRPPRC, PFKFB1, STARD8

Tabelle 3.10: Differentiell exprimierte Proteine der Zelllinie GM03189(-) nach Bestrahlung mit 10 Gy.

Zeitpunkte nach Bestrahlung mit 10 Gy	Zeitpunkte nach Bestrahlung mit 10 Gy			
		0,5 h	4 h	24 h
	0,5 h	---	---	ERO1L
	4 h		APEH, E2F, PLCG2	ACTN4, EEF2, GARS, HNRNP1, LRPPRC, MSN, RAD50, RUVBL1, ZBED4
	24 h	STAT5A, TLN1		ACO2, ALDOC, EIF3A, NCF2, SUV39H1, TRAP1, TUBA1B, WARS, XRCC5

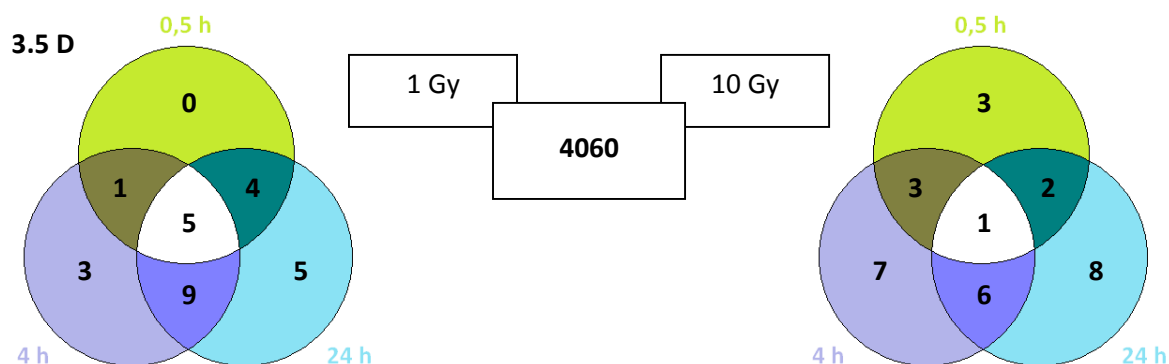


Abbildung 3.5 D: Venn-Diagramme, von allen differentiell exprimierten Proteinen 0,5 h, 4 h und 24 h nach Bestrahlung mit 1 Gy und 10 Gy in der Zelllinie 4060. Die Diagramme zeigen die Anzahl der unterschiedlich exprimierten Proteine nach 0,5 h (grün), 4 h (lila) und 24 h (hellblau) nach Bestrahlung mit 1 Gy und 10 Gy. Die Schnittmenge (weisser Bereich) umfasst alle Proteine, die zu allen 3 Zeitpunkten signifikant verändert sind.

Tabelle 3.11: Differentiell exprimierte Proteine der Zelllinie 4060 nach Bestrahlung mit 1 Gy.

Zeitpunkte nach Bestrahlung mit 1 Gy	Zeitpunkte nach Bestrahlung mit 1 Gy			
		0,5 h	4 h	24 h
	0,5 h		EZR	<i>HSP90AA1, MSN, THOP1, XRCC5</i>
	4 h	EZR	<i>GANAB, KLHL5, CPNE1</i>	<i>ACO2, EIF3A, HDLBP, KARS, MYH9, PLCG2, RDX, STARD8, TLN1</i>
	24 h	<i>APEH, EEF2, GARS, GFM1, RAD50</i>		<i>HK1, MMT1, LRPPRC, SND1, UBA6</i>

Tabelle 3.12: Differentiell exprimierte Proteine der Zelllinie 4060 nach Bestrahlung mit 10 Gy.

Zeitpunkte nach Bestrahlung mit 10 Gy	Zeitpunkte nach Bestrahlung mit 10 Gy			
		0,5 h	4 h	24 h
	0,5 h	<i>NDUFS1, UQCRC2,</i>	<i>FUBP1, H2AFV, NSFL1C</i>	<i>EHD1, PDIA6</i>
	4 h	<i>FUBP1, H2AFV, NSFL1C</i>	<i>CORO1A, GANAB, GOT2, HNRNPK, RNPEP, UBA1, XRCC6,</i>	<i>C10orf88, HNRNPL, RABGAP1L, SDHA, SFPQ, ZC3HAV1</i>
	24 h	<i>ALB</i>		<i>ALDOC, EEF2, HSPA5, MCM7, MX1, PPIA, PTPN1, TLN1</i>

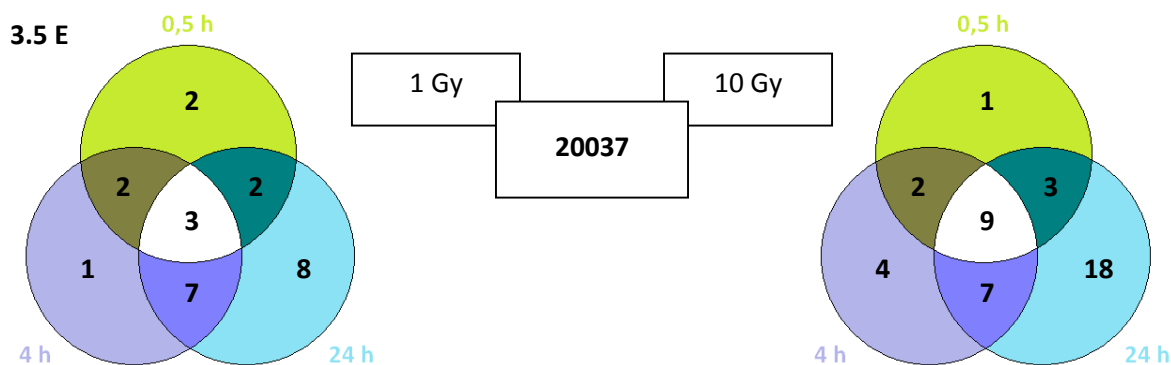


Abbildung 3.5 E: Venn-Diagramme, von allen differentiell exprimierten Proteinen 0,5 h, 4 h und 24 h nach Bestrahlung mit 1 Gy und 10 Gy in der Zelllinie 20037. Die Diagramme zeigen die Anzahl der unterschiedlich exprimierten Proteine nach 0,5 h (grün), 4 h (lila) und 24 h (hellblau) nach Bestrahlung mit 1 Gy und 10 Gy. Die Schnittmenge (weisser Bereich) umfasst alle Proteine, die zu allen 3 Zeitpunkten signifikant verändert sind.

Tabelle 3.13: Differentiell exprimierte Proteine der Zelllinie 20037 nach Bestrahlung mit 1 Gy.

Zeitpunkte nach Bestrahlung mit 1 Gy	Zeitpunkte nach Bestrahlung mit 1 Gy			
		0,5 h	4 h	24 h
0,5 h		ALDH18A , VCP	LRPPRC, PTPN6	ALDOC , NCF2
4 h		LRPPRC, PTPN6	UBA1	ACTR3, CORO1A , HNRNPL, NARS, PSMD13, SerpinB9, WDR1
24 h		ERO1L , FKBP4, RUVBL1		CCT3, CCT7, DPYSL2 , HNRNPH1 , HSPD1 , TCP1, TPI1, WARS

Tabelle 3.14: Differentiell exprimierte Proteine der Zelllinie 20037 nach Bestrahlung mit 10 Gy.

Zeitpunkte nach Bestrahlung mit 10 Gy	Zeitpunkte nach Bestrahlung mit 10 Gy			
		0,5 h	4 h	24 h
0,5 h		ATIC,	EIF3A, VCL,	NARS, PAICS, PDCD6IP
4 h			ANXA11 , MSN , PREX1, VCP	EZR , MTHFD1 , PFKB , PHB , RAN, SND1 , TUBB ,
24 h		EIF3F, ENO1, HK1, HNRNPK , HSP90B1 , P4HB , TCP1 , TUBA1B , UBA1		ACADM, ANXA4 , APEH, C1QBP , DARS , EEF2 , EIF4A2, HSPA8, LDHB , MX1 , PDIA3 , PPP2CB, PRDX4, RPSA, SDHA , STOML2, WDR1, YWHAZ

Die Überlappung der Proteine, zu allen 3 Zeitpunkten, ist in den sensitiven Zelllinien 4060 und GM03189(-) nach Bestrahlung mit 1 Gy größer, als nach Bestrahlung mit 10 Gy. Die normale Zelllinie 20037 zeigt ein gegenteiliges Expressionsmuster. Hier steigt die Anzahl der zu allen 3 Zeitpunkten differentiell exprimierten Proteine nach einer Bestrahlung mit 10 Gy. Die Linie HuKo zeigt, ebenso wie die strahlenunempfindliche Kontrolle GM03323(+), keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl differentiell exprimierter, gemeinsamer Proteine zu allen 3 Zeitpunkten zwischen 1 Gy und 10 Gy.

Der größte Unterschied wird 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy in den Zelllinien deutlich. In der unempfindlichen Linie GM03323(+) erhöht sich die Anzahl der differentiell exprimierten Proteine von 3 (1 Gy, 24 h) auf 17 Proteine. In der Linie 20037 ist die Anzahl der deregulierten Proteine von 8 auf 18 mehr als verdoppelt.

Trotz des geringen Regulationsfaktors sind nur wenige Proteine über die beobachteten Zeitpunkte differentiell exprimiert, wobei mehr Proteine zwischen 4 h und 24 h gemeinsam sind, als zwischen 0,5 h und 4 h, oder 0,5 h und 24 h.

In allen Linien, ausgenommen der Linie 20037, die die größte Anzahl deregulierter Proteine zeigt, sind 8-18 Proteine nach Bestrahlung verändert. Allen gemeinsam ist jedoch, dass nach Bestrahlung mit 10 Gy mehr Proteine dereguliert wurden, als nach Bestrahlung mit 1 Gy.

Der geringe Anteil gemeinsamer, intraindividuell deregulierter Proteine über die Zeit lässt auf eine unterschiedliche und zeitabhängige regulatorische Funktion der Proteine in der Strahlenantwort schließen.

Die große Anzahl differentiell exprimierter Proteine, 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy in den strahlenunempfindlichen Linien, könnte darauf schließen lassen, dass die Schadenantwort im Gegensatz zu den strahlenempfindlichen Zelllinien durch mehrere Signalwege moduliert werden kann.

3.4.4 Vergleich der differentiell exprimierten Proteine zwischen allen Zelllinien zu einem Zeitpunkt (0,5 h, 4 h und 24 h) nach Bestrahlung mit 1 Gy und 10 Gy

Um herauszufinden, wie viele Proteine interindividuell nach Bestrahlung dereguliert sind, wurden die identifizierten Proteine von einem Zeitpunkt und einer Dosis miteinander verglichen.

Das mitochondriale Protein *Leucine-rich PPR motif-containing protein* (LRPPRC) ist neben dem Protein HNRNPH1 das einzige Protein, das nach Bestrahlung mit 1 Gy in mehr als zwei Linien 24 h als dereguliert beobachtet wurde. Es ist in beiden sensitiven Linien herunterreguliert, während es in der Linie HuKo hochreguliert wurde. HNRNPH1 ist in den normal reagierenden Kontrolllinien HuKo und GM03323(+) 4 h und 24 h nach Bestrahlung hochreguliert, in der normal reagierenden Linie 20037 wurde es 24 h nach Bestrahlung als herunterreguliert beobachtet.

Nach Bestrahlung mit 1 Gy und Ernte nach 0,5 h, gibt es keine interindividuellen Gemeinsamkeiten der differentiell exprimierten Proteine. Nach 4 h, sowie 24 h ist das Protein Aconitase 2 in der sensitiven LUCY-Linie 4060 hochreguliert, in der normal reagierenden Linie HuKo ist es 24 h nach Bestrahlung herunterreguliert. 24 h nach 1 Gy Bestrahlung, ist die Regulation des mitochondrialen Proteins *Inner membrane protein* (IMMT) in diesen 2 Linien genau gegensätzlich dem vorangegangenen. ACTG1 ist in beiden Kontrolllinien GM03323(+) und GM03189(-) Linien zu allen drei Zeitpunkten herunterreguliert. CORO1A ist in den Linien GM03189(-) und 20037 gegensätzlich reguliert. In der sensitiven Linie GM03189(-) ist es 24 h nach Bestrahlung hochreguliert, in der Linie 20037 ist es sowohl 4 h, als 24 h nach Bestrahlung herunterreguliert. LRPPRC, IMMT, ACTG1 und CORO1A sind Strukturproteine. Die Deregulation dieser Proteine könnte darauf hindeuten, dass die Strahlenantwort mit Strukturänderungen in der Zelle einhergeht. HNRNPH1 ist Bestandteil des *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein* (hnRNP)-Komplexes, welcher an der mRNA Prozessierung und am mRNA-Spleißen beteiligt ist. Die Hochregulation weist darauf hin, dass die Translation in beiden normalen Kontrolllinien, im Gegensatz zur Linie 20037, angeschaltet wird. Aconitase 2 ist ein Enzym des Zitratzyklus. Die vermehrte Expression nach Bestrahlung in der sensitiven Linie deutet an, dass die Stoffwechselrate im Vergleich zu der unempfindlichen Linie erhöht wird.

NDUFS1 ist in der Linie HuKo zu den Zeitpunkten 4 h und 24 h herunterreguliert. Die Herunterregulierung war ebenfalls zu allen drei Zeitpunkten in der sensitiven Kontrolllinie GM03189(-) zu beobachten. NDUFS1 ist die Kern-Untereinheit der mitochondrialen

NADH Dehydrogenase, die an der Atmungskette beteiligt ist (Komplex I). Komplex I ist für den Elektronentransfer von NADH auf die Atmungskette verantwortlich.

In den Kontrolllinien GM03323(+) und GM03189(-) sind die Proteine ALB und ENO1 gemeinsam dereguliert. ALB, welches für den Vitamin E Transport zuständig ist, wird in beiden Linien nach Bestrahlung mit 1 Gy hochreguliert, wobei es in der sensitiven Linie zu allen Zeitpunkten beobachtet wurde, während ALB in der normalen Linie nur nach 4 h als signifikant herunterreguliert war. ENO1 liegt gegensätzlich reguliert vor. In der normalen Kontrolllinie ist es 4 h und 24 h nach Bestrahlung hochreguliert, in der sensitiven Linie 0,5 h und 24 h herunterreguliert. ENO1 ist an der Glykolyse beteiligt, einem metabolischen Prozess, bei dem Glucose in Pyruvat umgewandelt wird. Vorhergehende Arbeiten zeigen, dass Stress mit einer erhöhten Glykolyserate einhergeht (Ralser et al. 2007).

Nach Bestrahlung mit 1 Gy ist in den beiden Linien GM03189(-) und 20037 das Protein ERO1L zu allen drei Zeitpunkten herunterreguliert. ERO1L ist eine Oxidoreduktase, die an der Ausbildung von Disulfidbrücken im endoplasmatischen Retikulum beteiligt ist. ERO1L reoxidiert P4HB/PDI. Nach der Reoxidation von PH4B überträgt dieses seine Elektronen auf molekularen Sauerstoff, was zur Bildung von reaktivem Sauerstoffspezies (ROS = *reactive oxygen species*) in der Zelle führt. Es ist dokumentiert, dass ionisierende Strahlung zu Bildung von ROS in der Zelle führt, die sowohl Molekülschäden, als auch Schäden der DNA verursachen.

Den Linien GM03189(-) und 4060 ist lediglich 1 Protein in der Strahlenantwort gemeinsam, STARD8. Es wurde in beiden Linien 24 h nach Bestrahlung mit 1 Gy als herunterreguliert beobachtet. In der Linie 4060 ist es ebenfalls nach 4 h herunterreguliert. Dieses Protein ist an der Regulation der kleinen-GTPase-vermittelten Signal Transduktion beteiligt.

Im Vergleich zur Bestrahlung mit 1 Gy sind nach der Bestrahlung mit 10 Gy weitaus mehr Proteine interindividuell gemeinsam dereguliert. Es konnten jedoch nur drei Proteine identifiziert werden, die in mehr als zwei Linien als dereguliert beobachtet wurden. Das Protein *Elongation factor 2* (EEF2, beteiligt an Elongation der Translation) wird in beiden Kontrolllinien GM03323(+) (24 h) und GM03189(-) (4 h/24 h) herunterreguliert, während es in beiden LUCY-Linien 24 h post-Bestrahlung hochreguliert wurde. Das *Interferon-Induced GTP-binding Protein Mx1* (MX1, zellautonomer Restriktionsfaktor gegen virale Proteine) ist sowohl in beiden LUCY-Linien (24 h), als auch in der Kontrolllinie GM03323(+) (0,5 h/24 h) hochreguliert, während MX1 in der Linie HuKo nach 4 h ebenfalls hochreguliert, jedoch nach 24 h als herunterreguliert beobachtet wurde. PDIA6 besitzt Chaperonfunktion und ist in der sensitiven Linie 0,5 h und 24 h hochreguliert. In der Linie HuKo ist

es 0,5 h post-Bestrahlung herunterreguliert, in der Kontrolllinie GM03323(+) nach 24 h hochreguliert.

Den normalen Zelllinien GM03323(+) und 20037 sind insgesamt fünf Proteine gemeinsam. Die Protein Disulfid-Isomerase A3 (PDIA3, katalysiert die Neuverknüpfung der Disulfidbindungen) und Annexin A4 (ANXA4; involviert in Exocytose) sind in den unempfindlichen Linien GM03323(+) und 20037 nach 24 h hochreguliert. Das Chaperon HSP90B1 ist ebenfalls hochreguliert, wobei es in der Kontrolllinie nur 24 h post-Bestrahlung als dereguliert beobachtet wurde und in der normalen LUCY Linie zu allen drei Zeitpunkten eine Regulation in dieselbe Richtung aufweist. Das Protein *L-lactate-dehydrogenase B chain* (LDHB, Glykolyse) ist in der unempfindlichen Kontrolle nach 24 h herunterreguliert, in der unempfindlichen LUCY-Linie ist die Expression nach 24 h erhöht. P4HB agiert in hoher Konzentration als Chaperon, das die Aggregation falschgefalteter Proteine verhindert, in kleiner Konzentration übernimmt es die Funktion eines anti-Chaperons und unterstützt die Aggregation falschgefalteter Proteine. In der Linie GM03323(+) liegt es nach 24 h hochreguliert vor, während es in der Linie 20037 zu allen Zeitpunkten herunterreguliert wurde.

Lediglich das Strukturprotein ACTB ist in den beiden normal reagierenden Kontrolllinien HuKo (0,5 h / 24 h) und GM03323(+) (4h / 24 h) hochreguliert.

Nach Bestrahlung mit 10 Gy sind nur zwei Proteine in den normalen Linien HuKo und 20037 gemeinsam reguliert. Das Protein Annexin A11 (ANXA11) ist nach 4 h in beiden unempfindlichen Linien HuKo und 20037 hochreguliert. Annexin A11 ist am Zellzyklus und der Zellteilung beteiligt, was darauf hinweisen könnte, dass diese Proteine nach Bestrahlung mit 10 Gy noch zur Zellteilung fähig sind. PFKP (Glykolyse) ist in der Linie HuKo nach 0,5 h herunter-, nach 4 h hochreguliert, während es in der Linie 20037 zu den späteren Zeitpunkten 4 h und 24 h als herunterreguliert identifiziert wurde.

Das DNA-Reparaturprotein XRCC5 ist in der normal reagierenden Kontrolllinie HuKo 0,5 h und 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy hochreguliert. 24 h nach Bestrahlung wurde diese Deregulation ebenfalls in der Linie GM03189(-) beobachtet. XRCC5 ist die einzige Gemeinsamkeit in der differentiellen Proteinexpression zwischen den Linien HuKo und der sensitiven Linie GM03189(-).

Die Linien HuKo und 4060 haben ebenfalls nur ein Protein gemeinsam. EHD1 ist am intrazellularen Protein-Transport beteiligt und in beiden Linien 24 h nach Bestrahlung hochreguliert. In der Linie 4060 ist die Expression bereits nach 4 h signifikant erhöht.

HSPA5, ein weiteres Protein mit Chaperonfunktion, ist nach 24 h in der unempfindlicheren Kontrolle GM03323(+) und in der sensitiven LUCY-Linie 4060 hochreguliert. RABGAP1L ist am alternativen Spleißen beteiligt und in der sensitiven LUCY-Linie (4 h / 24 h) hochreguliert. In der Linie GM03323(+) ist es nur nach 0,5 h hochreguliert, zu den späteren Zeitpunkten liegt es vermindert exprimiert vor. MCM7 ist 24 h post-Bestrahlung in beiden Linien vermindert exprimiert.

HNRNPH1, dass bereits nach Bestrahlung mit 1 Gy in mehreren Linien dereguliert war, ist in den Linien GM03323(+) und GM03189(-) als einziges gemeinsames Protein 24 h post-Bestrahlung mit 10 Gy hochreguliert.

Beim Vergleich der Linien GM03189(-) und 20037 wurden drei gemeinsame Proteine als dereguliert identifiziert. Hierbei handelt es sich um die Strukturproteine EZR, MSN und TUBA1B. EZR und MSN werden in beiden Linien herunterreguliert, TUBA1B ist in der sensitiven Kontrolllinie 24 h nach Bestrahlung ebenfalls herunterreguliert, während es in der Linie 20037 zu allen drei Zeitpunkten eine verminderte Expression zeigt.

HNRNPK, ein an der mRNA-Prozessierung beteiligtes Protein, zeigt in der Linie 4060 4 h und 24 h post-Bestrahlung eine erhöhte Expression, während es in der Linie 20037 zu allen Zeitpunkten vermindert exprimiert wurde. UBA1, welches zur Aktivierung von Ubiquitin benötigt wird, ist in der Linie 4060 (4 h) herunterreguliert, in der Linie 20037 ist es über die gesamte Zeit hochreguliert. SDHA, ein Bestandteil der Atmungskette ist in der Linie 4060 zu den späten Zeitpunkten herunterreguliert, 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy ist es in der Linie 20037 hochreguliert.

Sowohl die Fructose-bisphosphat Aldolase C (ALDOC, Glykolyse), als auch das Strukturprotein TLN1 ist in beiden strahlensensitiven Linien vermindert exprimiert.

Nach der Bestrahlung mit 10 Gy wurden im Vergleich zur Bestrahlung mit 1 Gy mehr Proteine als gemeinsam dereguliert beobachtet. Es handelt sich hierbei zum Großteil um Strukturproteine und Chaperone. Letztere sind bekanntermaßen an der Stressantwort der Zelle beteiligt.

Der interindividuelle Vergleich zeigt jedoch keine spezifischen Expressionsmuster, die für ähnlich reagierende Zelllinien Gültigkeit haben. Die Strahlenantwort scheint für jede Zelllinie individuell zu sein.

3.5 Bioinformatische Analyse der differentiell exprimierten Proteine aus 2D-DIGE mit der Ingenuity Pathway Analysis Software (IPA)

Um die in der 2D-DIGE Analysen identifizierten, strahlenregulierten Proteine bestimmten biologischen Prozessen zuzuordnen, ist es gängig, diese mit Hilfe von Computerprogrammen zu analysieren.

Da eine Vielzahl der Proteine, oder miRNAs, keine klare, eindeutig klassifizierbare Funktion besitzen, da sie unterschiedliche Funktionen in der Zelle übernehmen können, lassen sie sich nicht linear trennen bzw. nicht eindeutig kategorisieren. Dies führt zu einer großen Überschneidung der zugrunde liegenden Daten bei der Zuordnung zu biologischen Prozessen, die eine kritische Betrachtung dieser Auswertung erfordert.

Die in dieser Arbeit generierten Daten wurden mittels der Software *Ingenuity Pathway Analysis* untersucht. Grundlage des Programms ist eine umfangreiche Datenbank, welche auf dem aktuellen Kenntnisstand der wissenschaftlichen Literatur (U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894, USA) basiert.

In der Software werden die Proteine in verschiedenen Kombinationen den unterschiedlichen Funktionen zugeordnet. In der Tabelle 3.15 sind die Proteinkombinationen der IPA-generierten Liste, die einen signifikanten p-Wert (rot hinterlegt) besaßen, gezeigt. Der p-Wert wird von der Software durch den einseitigen, exakten Fisher Test berechnet. Die Formel ist im Anhang Abbildung 2 aufgeführt.

Der p-Wert, der mit einer zellulären Funktion, oder einem Netzwerk assoziiert ist, gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der die Assoziation zwischen den Proteinen des Experiments und einer vorgegebenen biologischen Funktion, oder eines Signalwegs auf Zufall basiert. Je kleiner der p-Wert, desto kleiner ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Assoziation zufällig ist und desto signifikanter ist die Assoziation von Protein und biologischem Prozess.

Wie in der Tabelle 3.15 ersichtlich, werden die Kategorien in Funktionen unterteilt. Hier wurden nur die ersten vier Funktionen/Kategorie gezeigt. Die vollständigen Listen aller Zelllinien sind im Anhang Tabelle 5 A-J aufgeführt. Um die große Überschneidung zu verdeutlichen, sind die Proteine, die mehreren Kategorien zugeordnet wurden, gelb markiert.

Tabelle 3.15: Proteine und ihre zellulären Funktionen in der Linie 20037 4 h nach Bestrahlung mit 10 Gy (IPA-Auswertung). Der signifikante p-Wert ist rot, die Proteine, die mehreren Funktionen zugeordnet wurden, sind gelb hinterlegt dargestellt.

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cell Death and Survival	<i>cell death</i>	1,26E-07	ANXA4,C1QBP,ENO1, EZR,HK1,HNRNPK, HSP90B1,MSN,PHB, SND1,TCP1,TUBB,UBA1 ,VCP,YWHAZ
Cell Death and Survival	<i>apoptosis</i>	3,89E-06	ANXA4,C1QBP,ENO1, EZR,HNRNPK,HSP90B1, MSN,PHB,SND1,TCP1, VCP,YWHAZ
Cell Death and Survival	<i>Necrosis</i>	7,83E-06	ENO1,EZR,HK1,HNRNPK ,MSN,PHB,SND1,TCP1, TUBB,UBA1,VCP,YWHA Z
Cell Death and Survival	<i>apoptosis of tumor cell lines</i>	3,81E-05	ENO1,EZR,HNRNPK,MS NPHB,SND1,TCP1,VCP, YWHAZ
Cell Death and Survival	<i>cell death of tumor cell lines</i>	4,78E-05	ENO1,EZR,HK1,HNRNPK ,MSN,PHB,SND1,TCP1, VCP,YWHAZ
Cellular Development	<i>proliferation of tumor cell lines</i>	5,39E-06	C1QBP,EIF3A,EZR,HK1, HNRNPK,PFKP,PHB, SND1,TCP1,TUBB,UBA1
Cellular Development	<i>proliferation of breast cancer cell lines</i>	2,89E-04	C1QBP,EIF3A,HNRNPK, PFKP,UBA1
Cellular Development	<i>tubulogenesis of kidney cell lines</i>	4,15E-03	EZR
Cellular Development	<i>proliferation of endothelial cell lines</i>	4,80E-03	EIF3A,UBA1
Cellular Development	<i>proliferation of prostate cancer cell lines</i>	6,33E-03	HK1,PHB,SND1
Cellular Growth and Proliferation	<i>proliferation of tumor cell lines</i>	5,39E-06	C1QBP,EIF3A,EZR,HK1, HNRNPK,PFKP,PHB, SND1,TCP1,TUBB,UBA1
Cellular Growth and Proliferation	<i>proliferation of cells</i>	7,68E-06	ANXA11,C1QBP,EIF3A, ENO1,EZR,HK1,HNRNPK ,MTHFD1,PFKP,PHB,SN D1,TCP1,TUBB,UBA1
Cellular Growth and Proliferation	<i>proliferation of breast cancer cell lines</i>	2,89E-04	C1QBP,EIF3A,HNRNPK, PFKP,UBA1
Cellular Growth and Proliferation	<i>proliferation of endothelial cell lines</i>	4,80E-03	EIF3A,UBA1
Cellular Growth and Proliferation	<i>proliferation of prostate cancer cell lines</i>	6,33E-03	HK1,PHB,SND1

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cellular Movement	cell movement	7,40E-06	C1QBP, EIF3A, EZR, HNRNPK, MSN, PHB, PREX1, VCL, VCP, YWHAZ
Cellular Movement	cell movement of tumor cell lines	1,31E-05	C1QBP, EIF3A, EZR, HNRNPK, MSN, PHB, PREX1, VCP
Cellular Movement	migration of cells	2,26E-05	C1QBP, EZR, HNRNPK, MSN, PHB, PREX1, VCL, VCP, YWHAZ
Cellular Movement	migration of tumor cell lines	3,58E-05	C1QBP, EZR, HNRNPK, MSN, PHB, PREX1, VCP
Cellular Movement	migration of cytotrophoblastic cells	1,39E-03	C1QBP
Free Radical Scavenging	synthesis of reactive oxygen species	3,59E-04	HK1, HNRNPK, PREX1, YWHAZ
Free Radical Scavenging	formation of reactive oxygen species	4,57E-04	PREX1, YWHAZ
Free Radical Scavenging	production of reactive oxygen species	2,03E-03	HK1, HNRNPK, YWHAZ
Free Radical Scavenging	metabolism of superoxide	1,51E-02	PREX1

Da alle verfügbaren integrativen Netzwerk-Analyse-Softwarepakete basierend auf Literaturdatenbanken arbeiten, ist dieser Effekt auch bei der Nutzung von DAVID, STRING oder Cytoscape vorhanden. Als Beispiel ist in Tabelle 3.16 ein Auszug der Auswertung mit der Software DAVID gezeigt. Bei dieser Analyse gibt es im Vergleich zu IPA keine übergeordneten Kategorien.

Tabelle 3.16: Proteine und ihre zellulären Funktionen in der Linie 20037 4 h nach Bestrahlung mit 10 Gy (DAVID-Auswertung). Der signifikante p-Wert ist rot, die Proteine, die mehreren Funktionen zugeordnet wurden, sind gelb hinterlegt dargestellt.

Kategorie	Anzahl Proteine	P-Wert	Proteine
macromolecular complex assembly	7	8,7E-05	TUBB, PFKP, PREX1, TCP1, EIF3A, TUBA1B, VCP
macromolecular complex subunit organization	7	9,5E-05	TUBB, PFKP, PREX1, TCP1, EIF3A, TUBA1B, VCP
protein complex biogenesis	6	0,0014	TUBB, PFKP, PREX1, TCP1, TUBA1B, VCP
protein complex assembly	6	0,0014	TUBB, PFKP, PREX1, TCP1, TUBA1B, VCP

regulation of apoptosis	7	0,0018	TUBB, PHB, PREX1, HSP90B1, ANXA4, VCP, YWHAZ
cellular macromolecular complex assembly	5	0,0019	TUBB, PREX1, TCP1, EIF3A, TUBA1B
regulation of programmed cell death	7	0,0019	TUBB, PHB, PREX1, HSP90B1, ANXA4, VCP, YWHAZ
regulation of cell death	7	0,0020	TUBB, PHB, PREX1, HSP90B1, ANXA4, VCP, YWHAZ
cellular protein complex assembly	4	0,0025	TUBB, PREX1, TCP1, TUBA1B
cellular macromolecular complex subunit organization	5	0,0028	TUBB, PREX1, TCP1, EIF3A, TUBA1B
glycolysis	3	0,0029	PFKP, ENO1, HK1
protein polymerization	3	0,0031	TUBB, PREX1, TUBA1B
glucose catabolic process	3	0,0043	PFKP, ENO1, HK1
cytoskeleton organization	5	0,0058	TUBB, EZR, PREX1, TUBA1B, RAN
hexose catabolic process	3	0,0061	PFKP, ENO1, HK1
monosaccharide catabolic process	3	0,0064	PFKP, ENO1, HK1
alcohol catabolic process	3	0,0083	PFKP, ENO1, HK1
membrane to membrane docking	2	0,0085	EZR, MSN
cellular carbohydrate catabolic process	3	0,0091	PFKP, ENO1, HK1
carbohydrate catabolic process	3	0,0146	PFKP, ENO1, HK1
microtubule cytoskeleton organization	3	0,0256	TUBB, TUBA1B, RAN
glucose metabolic process	3	0,0275	PFKP, ENO1, HK1
ER-associated protein catabolic process	2	0,0400	HSP90B1, VCP
hexose metabolic process	3	0,0417	PFKP, ENO1, HK1
leukocyte adhesion	2	0,0466	EZR, MSN
anti-apoptosis	3	0,0473	HSP90B1, ANXA4, YWHAZ

Trotz der gezeigten Probleme wurde für die weitere Auswertung der Proteine und miRNAs die Software IPA verwendet, da dieses Programm für die Auswertung von Proteomics-Datensätzen häufig genutzt wird (Heroux et al. 2014; Shen et al. 2014; Yentrapalli et al. 2013; Shriharshan et al. 2012).

3.5.1 Zelluläre Funktionen der differentiell exprimierten Proteine

Die Zuordnung der deregulierten Proteine zu bestimmten molekularen und zellulären Funktionen ist in den Abbildungen 3.6 A-J dargestellt. Ziel dieser Analyse ist es, die große Anzahl an veränderten Proteinen, die aus den 2D-DIGE Experimenten generiert wurden, biologischen Netzwerken zuzuordnen, um ihre Funktion in der Zelle zu ermitteln. Wie unter 3.5 beschrieben, ist hierbei kritisch zu betrachten, dass die Software eine Vielzahl der Proteine mehreren Signalwegen und Funktionen zuordnet. Diesgemäß sind die prozentualen Werte ungenau, da keine klare Klassifizierung der Proteinfunktionen möglich ist. Die Bezeichnung der Funktionen ist der Software entnommen und die Definitionen sind im Anhang der Tabelle 4 zu entnehmen. Die Listen der in die Analyse eingegangenen Proteine und deren Regulation sind ebenfalls im Anhang (Tabellen 5 A-J) einzusehen. Zum Zeitpunkt 0,5 h sind in einigen Linien nicht genug Proteine dereguliert und somit nicht in dieser Form darstellbar.

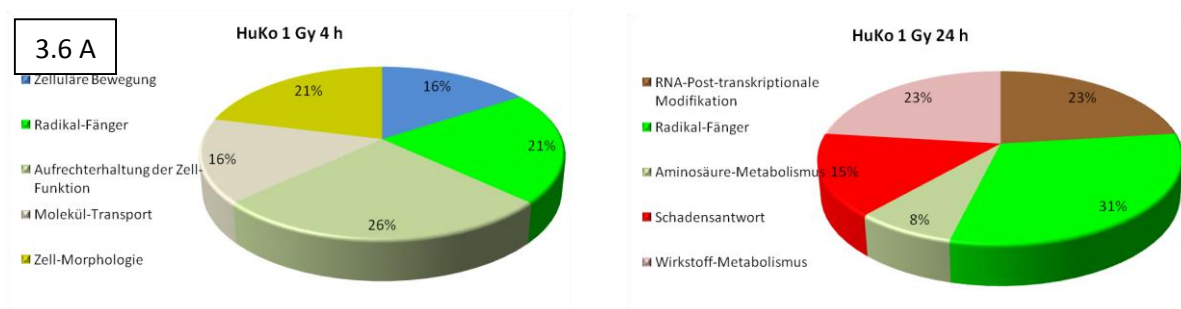


Abbildung 3.6 A Prozentuale Beteiligung der signifikant veränderten Proteine der Linie HuKo nach Bestrahlung mit 1 Gy zu den Zeitpunkten 4 h und 24 h.

3.6 B

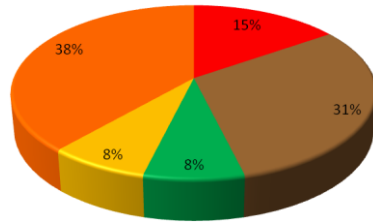
■ Schadensantwort

■ RNA Post-Transkriptionale Modifikation
■ Aminosäure-Metabolismus

■ Kohlehydrat-Metabolismus

■ Zelluläre Entwicklung

GM03323(+) 1 Gy 4 h



■ Zellzyklus

■ Zell/Zell-Signalgebung und Interaktion

■ Fettsäure-Metabolismus

■ Niedermolekulare Biochemie

■ Zell-Proliferation

GM03323(+) 1 Gy 24 h

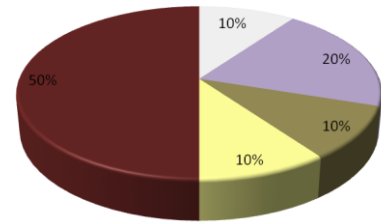


Abbildung 3.6 B Prozentuale Beteiligung der signifikant veränderten Proteine der Linie GM03323(+) nach Bestrahlung mit 1 Gy zu den Zeitpunkten 4 h und 24 h.

3.6 C

■ Zelluläre Entwicklung

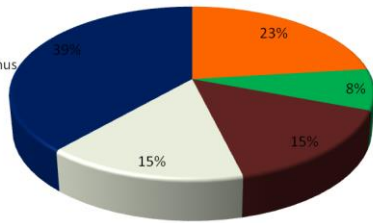
■ Aminosäure-Metabolismus

■ Zell-Proliferation

■ Zellzyklus

■ Zellaufbau und Organisation

GM03189(-) 1 Gy 4 h



■ Zelltod und Überleben

■ Zelluläre Entwicklung

■ Zell-Proliferation

■ Genexpression

■ Zell-Morphologie

GM03189(-) 1 Gy 24 h

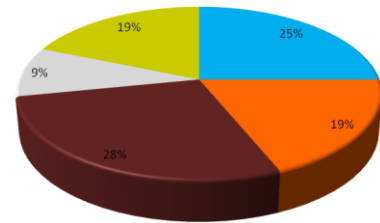


Abbildung 3.6 C Prozentuale Beteiligung der signifikant veränderten Proteine der Linie GM03189(-) nach Bestrahlung mit 1 Gy zu den Zeitpunkten 4 h und 24 h.

3.6 D

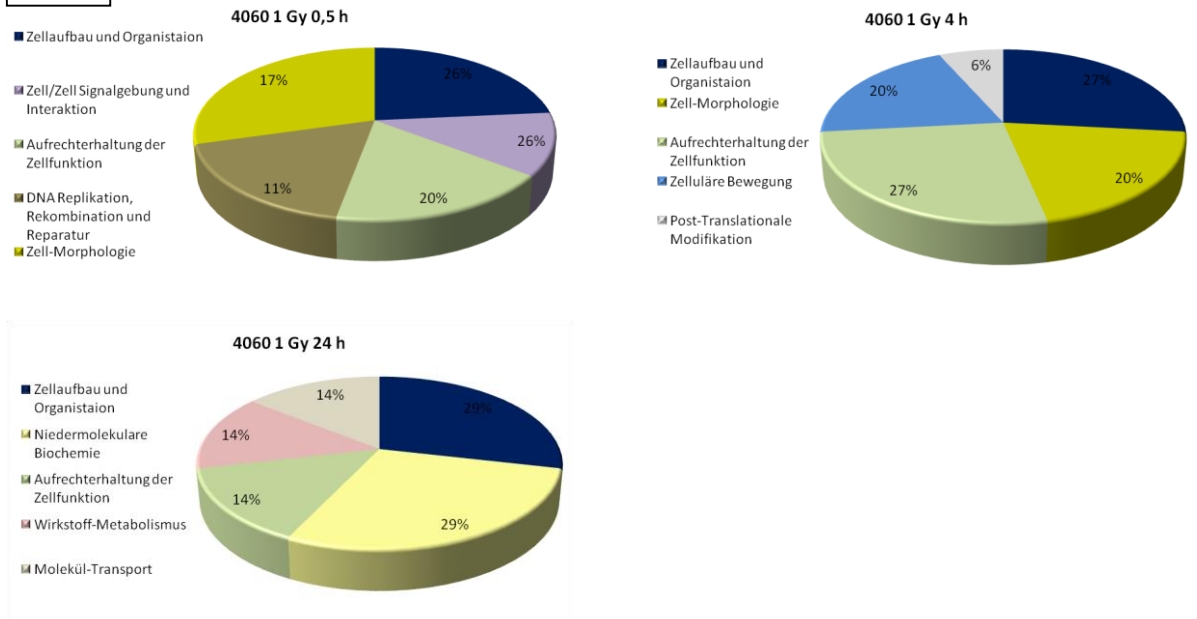


Abbildung 3.6 D Prozentuale Beteiligung der signifikant veränderten Proteine der Linie 4060 nach Bestrahlung mit 1 Gy zu den Zeitpunkten 0,5 h, 4 h und 24 h.

3.6 E

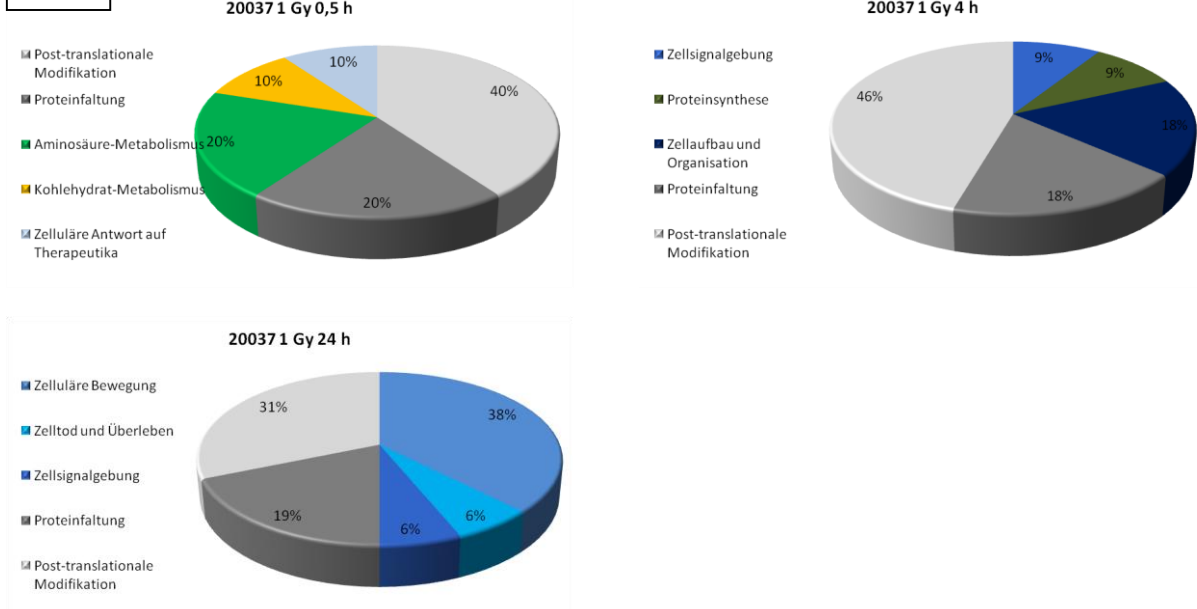


Abbildung 3.6 E Prozentuale Beteiligung der signifikant veränderten Proteine der Linie 20037 nach Bestrahlung mit 1 Gy zu den Zeitpunkten 0,5 h, 4 h und 24 h.

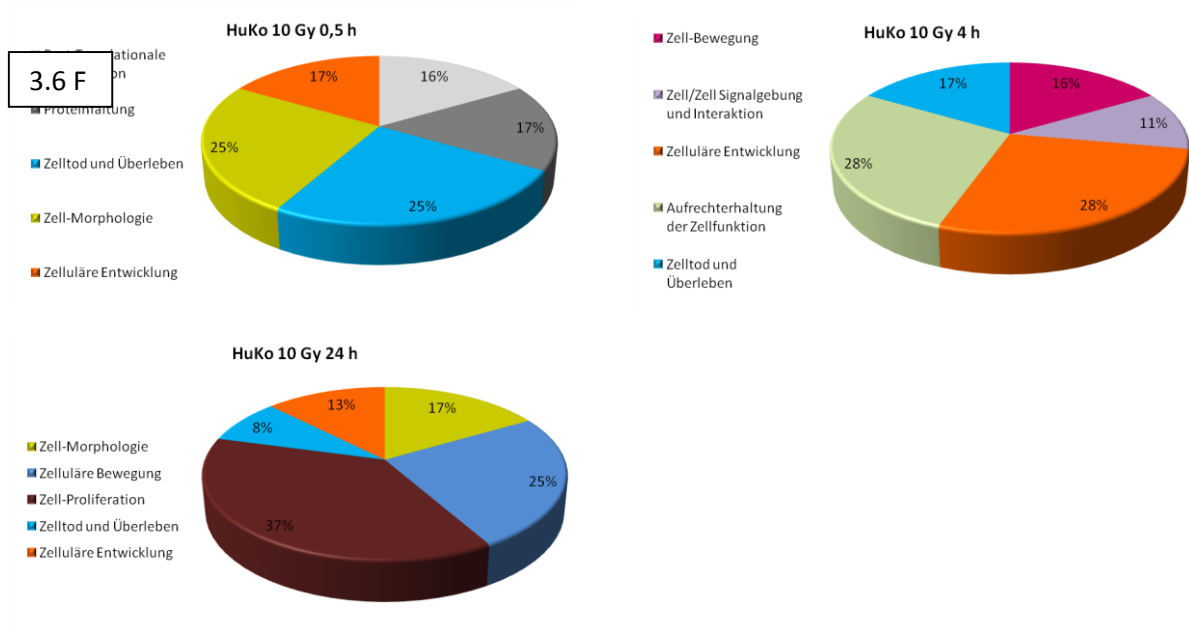


Abbildung 3.6 F Prozentuale Beteiligung der signifikant veränderten Proteine der Linie HuKo nach Bestrahlung mit 10 Gy zu den Zeitpunkten 0,5 h, 4 h und 24 h.

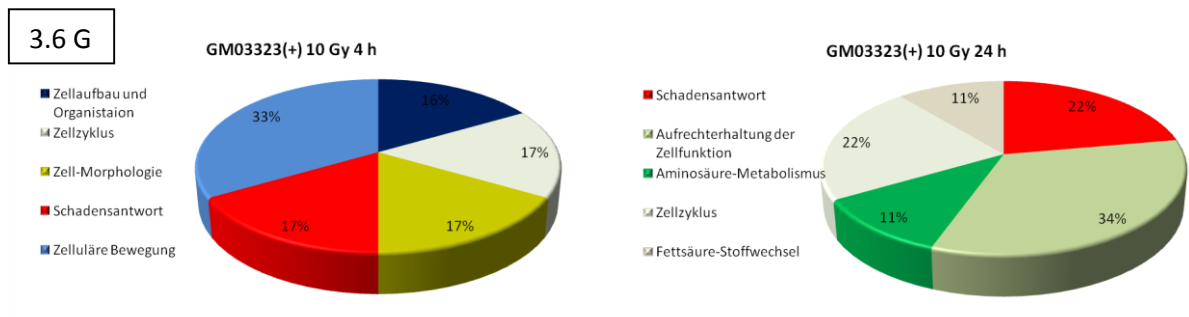


Abbildung 3.6 G Prozentuale Beteiligung der signifikant veränderten Proteine der Linie GM03323(+) nach Bestrahlung mit 10 Gy zu den Zeitpunkten 4 h und 24 h.

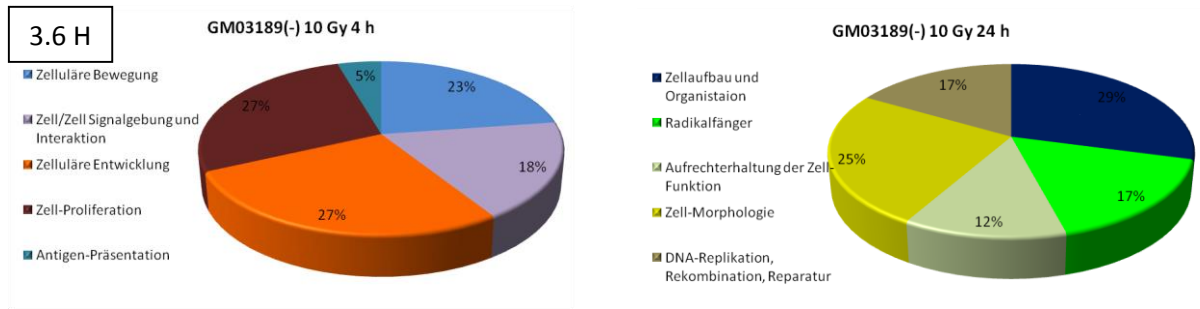


Abbildung 3.6 H Prozentuale Beteiligung der signifikant veränderten Proteine der Linie GM03189(-) nach Bestrahlung mit 10 Gy zu den Zeitpunkten 4 h und 24 h.

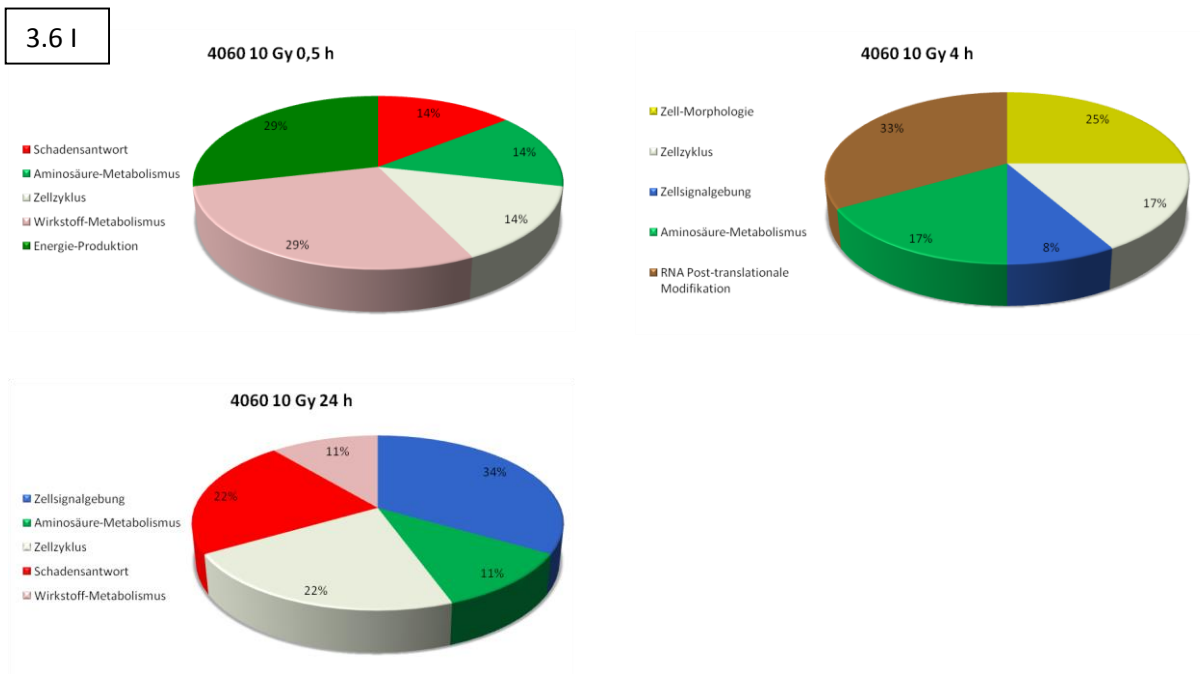


Abbildung 3.6 I Prozentuale Beteiligung der signifikant veränderten Proteine der Linie 4060 nach Bestrahlung mit 10 Gy zu den Zeitpunkten 0,5 h, 4 h und 24 h.

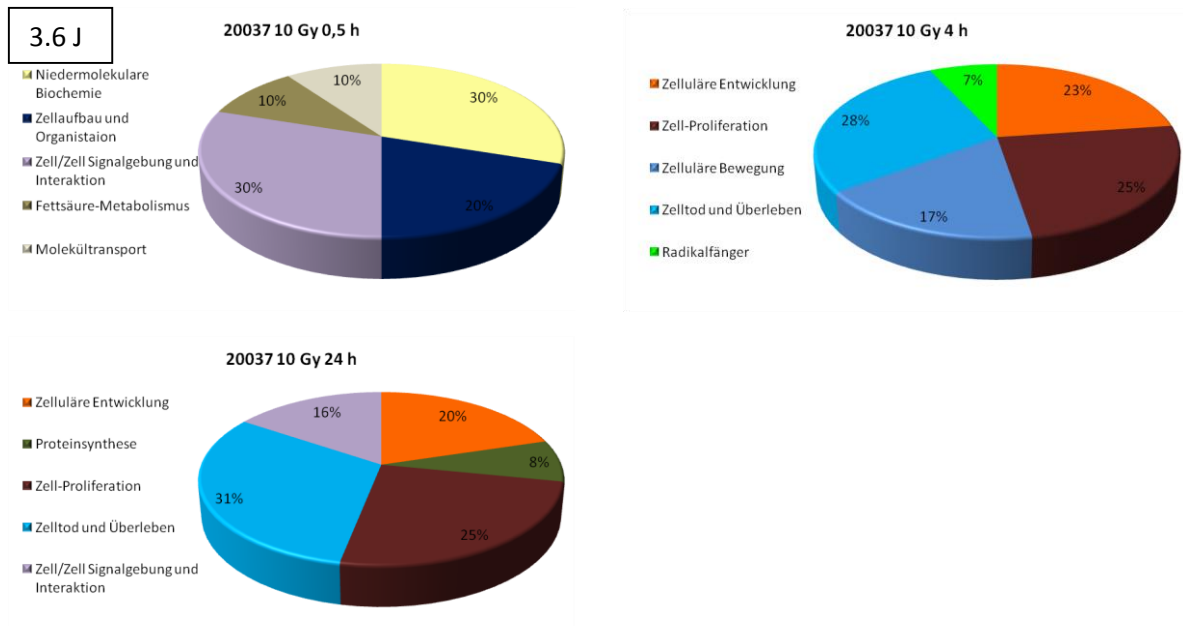


Abbildung 3.6 J Prozentuale Beteiligung der signifikant veränderten Proteine der Linie 20037 nach Bestrahlung mit 10 Gy zu den Zeitpunkten 0,5 h, 4 h und 24 h.

Die Kuchendiagramme verdeutlichen, dass die intraindividuelle Variabilität in der Proteinexpression nach Bestrahlung mit 1 Gy bzw. 10 Gy nicht sehr hoch ist. Die Proteinexpression bleibt bei Betrachtung einer Dosis und einer Zelllinie über die Zeit meist relativ stabil. Die Linie GM03323(+) zeigt jedoch nach Bestrahlung mit 1 Gy und mit 10 Gy intraindividuell ein unterschiedliches Expressionsmuster, das ebenfalls nach Bestrahlung mit 10 Gy auf die Linie GM03189(-) zutrifft.

In der intraindividuellen Strahlenantwort besteht keine Ähnlichkeit zwischen der niedrigen und der hohen Bestrahlungsdosis und somit lässt sich kein allgemein gültiges Muster erkennen. Die Reaktion auf Bestrahlung scheint individuell abhängig von Dosis und Zeit reguliert zu werden.

Darüber hinaus gibt es ebenfalls keine interindividuellen Ähnlichkeiten zwischen Zelllinien mit ähnlichem Phänotyp, die Rückschlüsse über Gemeinsamkeiten in der Regulation der Strahlenantwort auf Proteinebene zulassen.

Diese Erkenntnis verdeutlicht die Schwierigkeit einen Marker zu finden, der die individuelle Strahlenempfindlichkeit eindeutig bestimmen kann.

3.5.2 Netzwerke der differentiell exprimierten Proteine

Ziel dieser Analyse ist es, die große Anzahl an veränderten Proteinen, die aus den vorangegangenen Experimenten generiert wurden, zu kombinieren und biologischen Netzwerken zuzuordnen und die biologische Verbindung zwischen einzelnen Faktoren in einer zweidimensionalen Graphik zu visualisieren.

Die Netzwerke basieren auf der Konnektivität der Proteine mit anderen Proteinen und werden von der Software mit einer Score bewertet. Die Score wird von einem p-Wert abgeleitet und gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der die Proteine basierend auf dem Zufall dem Netzwerk zugeordnet werden. Die Score 2 gibt an, dass die Proteine mit einer Wahrscheinlichkeit 1 von 100 zufällig in einem Netzwerk zusammen sind (Long et al. 2004) Scores > 2 besitzen demnach eine 99 % Konfidenz, nicht durch Zufall generiert zu werden. Wird eine Punktzahl > 20 erreicht, wird ein Netzwerk hier als hochsignifikant angesehen und in die Auswertung mit einbezogen. Die Annahme dieser Analyse ist: Je mehr Verbindungen ein Protein im Netzwerk besitzt, umso „wichtiger“ ist seine Funktion.

Im Zentrum der generierten Netzwerke befinden sich demnach die Proteine mit den meisten Vernetzungen, die von der differentiellen Expression durch Interaktion betroffen sind. Die hier betroffenen Proteine sind als wichtiger Knotenpunkt für die Zelle bekannt und geben somit einen Hinweis über das Schicksal der Zelle nach Bestrahlung, wie z.B. Apoptose. Beispielhaft sind 2 dieser Netzwerke mit der höchsten Score in den Abbildungen 3.7 und 3.8 dargestellt.

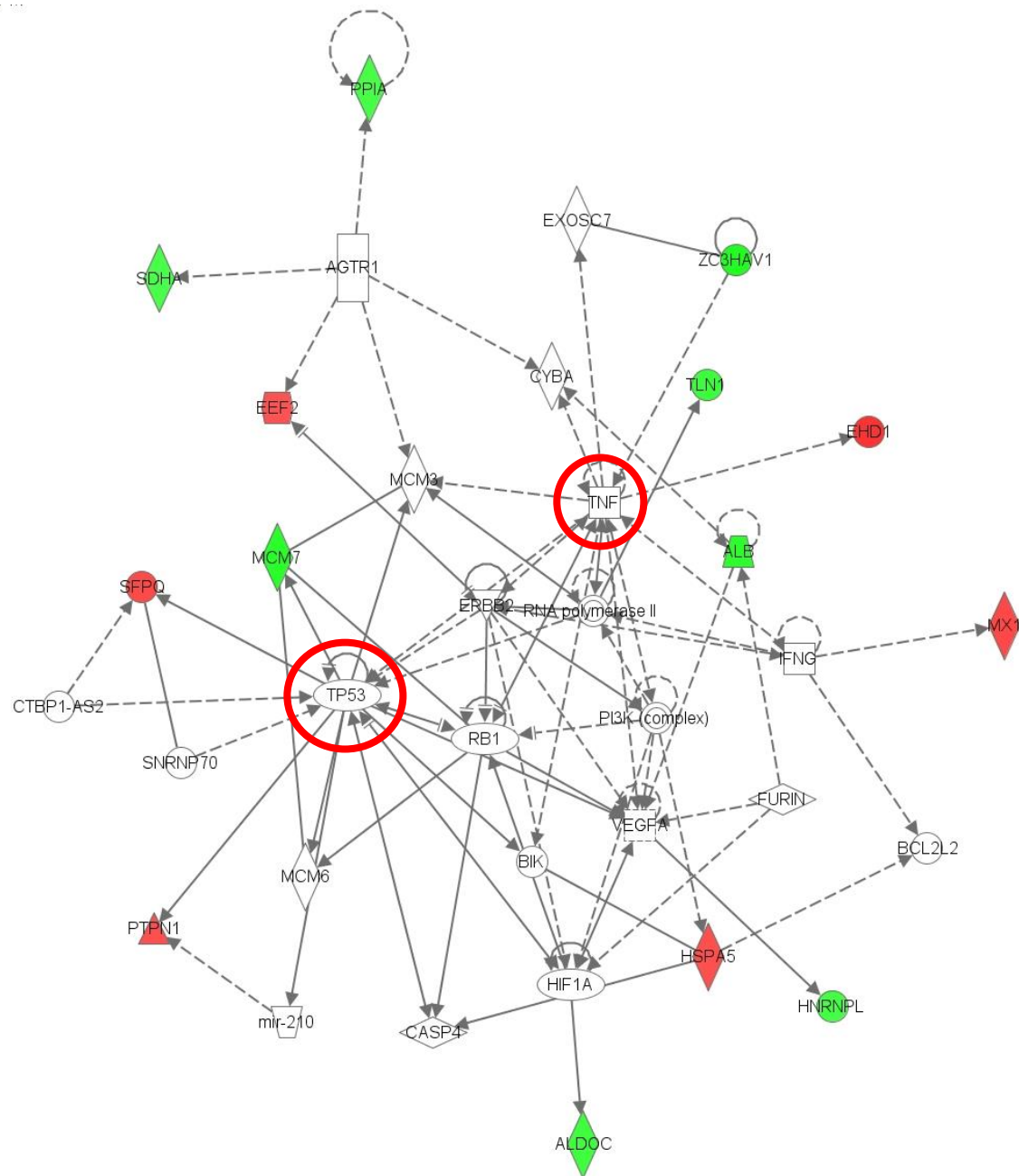


Abbildung 3.7: Netzwerk der deregulierten Proteine in der Linie 4060 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy. Das Netzwerk besitzt eine Score von 36 und beinhaltet die Funktionen (IPA) *Cellular Movement*, *Hematopoiesis* und *Immune Cell Trafficking*. 14 Moleküle aus den vorangegangenen Experimenten wurden in die Analyse aufgenommen. Die zentralen Proteine, die das Schicksal der Zelle nach Bestrahlung determinieren sind TP53 und TNF (roter Kreis).

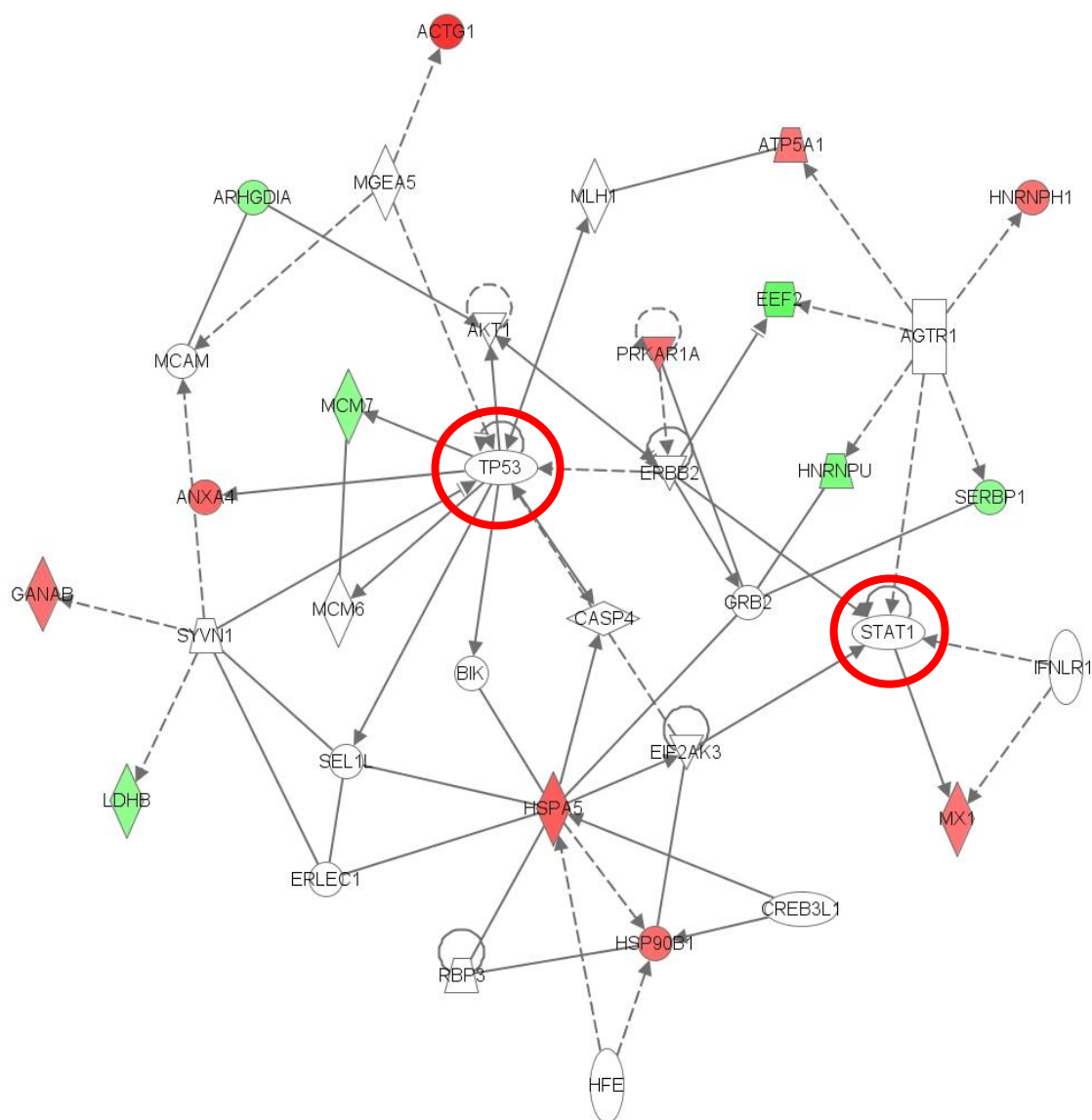


Abbildung 3.8: Netzwerk der deregulierten Proteine in der Linie GM03323(+) 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy. Das Netzwerk wird mit eine Score von 34 bewertet und beinhaltet die Funktionen (IPA) *Cellular Compromise, Cellular Function and Maintenance* und *Cellular Growth and proliferation*. 15 Moleküle aus den vorangegangenen Experimenten wurden in die Analyse aufgenommen. Die zentralen Proteine, die das Schicksal der Zelle nach Bestrahlung determinieren sind TP53 und STAT1 (roter Kreis).

In den Tabellen 3.17 A/B ist die jeweilige Score des Netzwerks für jede Zelllinie gezeigt. Darüber hinaus sind die zentralen Proteine, die in einem Netzwerk betroffen sind, aufgeführt.

In der Literatur werden häufig Netzwerke mit einem Score > 10 als signifikant bewertet (Kraemer et al. 2013). Die betroffenen zentralen Proteine sind in den Tabellen kursiv dargestellt.

Tabelle 3.17 A: Zentrale Proteine der signifikanten IPA-Netzwerke 0,5 h, 4 h und 24 h nach Bestrahlung mit 1 Gy: Die Proteine, die als Knotenpunkt das Schicksal der Zelle nach Bestrahlung determinieren sind für jede Zelllinie und jeden Zeitpunkt dargestellt. Die kursiv markierten Proteine gehören zu Netzwerken, die mit einer Score > 10 und < 20 bewertet wurden und in dieser Arbeit als nicht signifikant gewertet wurden.

Zelllinie	1 Gy 0,5 h	1 Gy 4 h	1 Gy 24 h
HuKo	<i>TP53</i> (Score 12)	MYC / <i>TP53</i> (Score 20)	<i>IL6</i> (Score 29)
GM03323(+)	---	<i>IL6 / IL8</i> (Score 17)	<i>STAT1</i> (Score 12)
GM03189(-)	---	<i>IL6</i> (Score 13)	HIF1A (Score 21)
4060	<i>TP53</i> (Score 17)	MYC (Score 23)	MYC (Score 26)
20037	MYC (Score 20)	TP53 (Score 21)	NFkB (Score 30)

Tabelle 3.17 B: Zentrale Proteine der signifikanten IPA-Netzwerke 0,5 h, 4 h und 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy: Die zentralen Proteine sind für jede Zelllinie und jeden Zeitpunkt dargestellt. Die kursiv markierten Proteine gehören zu Netzwerken, die mit einer Score > 10 und < 20 bewertet wurden und in dieser Arbeit als nicht signifikant gelten.

Zelllinie	10 Gy 0,5 h	10 Gy 4 h	10 Gy 24 h
HuKo	<i>HIF1A / TP53 / STAT1</i> (Score 17)	AKT/ERK / <i>HIF1A / NFkB</i> (Score 20)	NFkB / TNF (Score 30)
GM03323(+)	---	<i>CDH1 / TP53</i> (Score 13)	TP53 / <i>STAT1</i> (Score 34)
GM03189(-)	---	TNF (Score 27)	NFkB (Score 23)
4060	<i>TP53</i> (Score 11)	TP53 (Score 27)	TP53 / TNF (Score 36)
20037	TP53 / MYC (Score 21)	TP53 / NFkB (Score 28)	NFkB (Score 25)

Die betroffenen Knotenpunkte sind Proteine der Stressantwort.

Das wohl bekannteste Protein ist das Tumor Suppressor Protein TP53. Es reguliert die genomische Integrität indem es, durch Verhindern der Polyploidisierung, das Genom stabilisiert. TP53 determiniert das Schicksal der Zelle. Es reguliert, ob sie den DNA-Schaden und Zellzyklusarrest überwindet, die Zelle in die Seneszenz übergeht, oder der programmierte Zelltod irreversibel eingeleitet wird (Fei und El-Deiry. 2003; Braithwaite et al. 2005; Zamzami und Kroemer. 2005; Helton und Chen. 2007, Riley et al. 2008; Jackson et al. 2011).

NFκB ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der nach Strahlung aktiviert wird. Die Aktivierung führt zur Expression vorwiegend antiapoptotischer und proonkogener Gene. Es wird vermutet, dass eine Über-Aktivierung von NFκB das Krebsrisiko nach Bestrahlung erhöht (Dent et al. 2003).

IL6 ist ein Zielprotein von NFκB. Es ist in die Induktion der Seneszenz bei Zellen involviert, indem es proliferative und mitogene Signalwege inhibiert (Kortlever et al. 2006; Kuilman et al. 2008). Zelluläre Seneszenz beschreibt einen terminalen Zellzyklus-Arrest. Nach zellulärem Stress u.a. durch aktivierte Onkogene oder DNA-schädigende Agentien wird Seneszenz induziert und kann so zur Tumorsuppression beitragen.

TNF (*Tumor necrosis factor*) aktiviert JNK und p38 MAPK. JNK agiert nach Aktivierung durch TNF als proapoptotische Kinase (Ouwens et al. 2001).

ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), ist ebenfalls von MAPK vermittelten Signalwegen nach ionisierender Bestrahlung betroffen und wird durch mitogene Wachstumsfaktoren und Zytokine aktiviert. Die Aktivierung von ERK erfolgt sehr schnell nach Bestrahlung und führt zur Regulation des Zellwachstums und Zellüberlebens (Munshi und Ramesh. 2013)

Die Aktivierung von AKT, auch bekannt als Proteinkinase B führt zur Phosphorylierung einer Vielzahl von Proteinen, wie Bad und Caspase 9, die das Zellüberleben fördern (Roos und Kaina. 2012).

STAT1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 1*) ist der Hauptmediator der Interferoninduzierten Signalkaskade. STAT1 vermittelt pro-apoptotische Prozesse und agiert als Tumorsuppressor (Levy et al. 2002; Samuel. 2001). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine Überexpression des STAT1 Signalwegs zu Radioresistenz führt (Khodarev et al. 2004; Khodarev et al. 2007; Weichselbaum et al. 2008).

MYC ist ein Transkriptionsfaktor, der als Regulator von Zellwachstum, Proliferation und Apoptose agiert. Die Überexpression führt zu vermehrten DNA-Doppelstrangbrüchen, genetischer Instabilität und Tumorgenese (Li et al. 2012)

HIF1A (*Hypoxia-inducible factor 1-alpha*) ist der Hauptregulator der Transkription in der adaptiven Antwort auf Hypoxie. HIF1A moduliert mehr als 100 Gene, die eine wichtige Rolle bei der Adaptation an Hypoxie spielen (Moeller et al. 2006; Semenza 2003). Darüber hinaus ist bekannt, dass HIF1A nach der Radiotherapie hochreguliert wird. Dies induziert die Bildung von Cytokinen,

die die Zelle vor dem Strahleneffekt schützen können (Moeller et al. 2004). Die Aktivierung von HIF1A führt zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Strahlung (Moeller et al. 2006).

Wie jedoch bereits bei den vorhergegangenen Vergleichen, gibt es auch hier bezüglich der betroffenen Proteine der Netzwerke keine Übereinstimmung bei den Zelllinien mit ähnlichem Phänotyp. Dies stärkt die Hypothese, dass die Strahlenantwort individuell reguliert wird.

3.6 Auswahl einzelner Proteine zur Validierung der 2D-DIGE Regulationsfaktoren

Die Auswahl der Proteine (ausgenommen Strukturproteine) für die Analyse mit Western Blot erfolgte über eine Recherche in der Datenbank Swissprot. Es wurden Proteine ausgewählt, die an bekannten Endpunkten der Strahlenantwort beteiligt sind.

Dieser Arbeit ging bereits eine 2D-Gel basierte Proteomstudie von drei Zelllinien der LUCY-Studie voraus (17001, 13058 und 14017), in der die Proteinveränderungen 24 h und 48 h nach ¹³⁷Cs Gamma-Bestrahlung mit 6 Gy und 12 Gy analysiert wurde. Hier waren die Proteine MCM7 und SerpinB9 ebenfalls dereguliert (mündliche Mitteilung Anton Posch). Diese Experimente wurden mit fluoreszenzgefärbten Gelen, ohne vorherige Markierung mit Cyanin-Farbstoffen durchgeführt. Da MCM7 und SerpinB9 mit dieser weniger sensitiven 2D-Methode validierbar dereguliert waren, ist davon auszugehen, dass die genannten Proteine an der Strahlenantwort beteiligt sind. MCM7 wurde zusätzlich auf Ebene des Transkriptom mit Hilfe einer *array*-basierten Methode (Affymetrix) 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy in den Linien 4060 und 20037 als herunterreguliertes Transkript nachgewiesen (mündliche Mitteilung Kristian Unger, ISB). Aufgrund dessen wurden MCM7 und zusätzlich SerpinB9 als Kandidatenproteine ausgewählt.

Das Reparaturprotein RAD50 ist nur in den sensitiven Linien GM03189(-) und 4060 herunterreguliert, während es in allen anderen Linien als nicht dereguliert vorlag und wurde als weiteres Zielprotein gewählt.

Um sicher zu stellen, dass die virale Immortalisierung der Zellen keinen Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit der charakterisierten Zelllinien hat, wurde in den Listen nach deregulierten, viralen Proteinen gesucht. Das Protein SND1 ist das einzige deregulierte Protein, das nach der Datenbank-Recherche mit dem EBV in Verbindung gebracht werden konnte. SND1

ist der Co-Aktivator für die Transkription des Proteins EBNA2 ist, welches ein virales Protein des EBV ist.

3.7 Validierungen der 2D-DIGE Regulationsfaktoren durch quantitativen Western Blot

3.7.1 Validierung der Regulationsfaktoren durch Normalisierung mit einer Ladekontrolle

Um die Ergebnisse der differentiellen 2D DIGE Analyse zu validieren, wurden einige Proteine mittels Western Blot untersucht. Von den veränderten Proteinen wurden 4 getestet von denen kommerziell erhältliche Antikörper verfügbar waren (MCM7, SerpinB9, RAD50 und SND1). Die Western Blot Analysen zur Validierung wurden mit denselben Extrakten durchgeführt, die zur 2D DIGE Analyse verwendet wurden. Zur Normalisierung der Blots diente Aktin oder Tubulin.

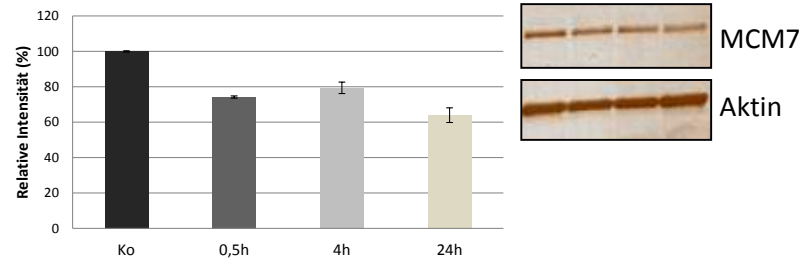
Abbildung 3.9 A-G zeigt die Ergebnisse der 4 analysierten Proteine im Western Blot und die Übereinstimmung der Ergebnisse mit der DIGE Analyse. Nicht signifikante Regulationsfaktoren sind kursiv gekennzeichnet.

Die 4 getesteten Antikörper wurden, neben der Validierung in der jeweiligen Zelllinie, noch zusätzlich in den übrigen DIGE-analysierten Zelllinien der LUCY-Studie getestet, um zu überprüfen, ob die ausgewählten Proteine auch in diesen Zelllinien dereguliert wurden.

Um herauszufinden, ob die Deregulation in strahlensensitiven und –resistenten Linien übereinstimmt und um das Kollektiv zu vergrößern, wurde darüber hinaus die Expression der Proteine MCM7 und SerpinB9 in den anderen strahlenempfindlichen LUCY-Zelllinien 4008, 4040, 4064, 20038 und 36011 getestet, Hierfür wurden die Linien mit 1 Gy bestrahlt, nach 0,5 h, 4 h und 24 h geerntet und Gesamtzellextrakte generiert (6.5.4.2). Die Western Blots der Linie 4039 nach Bestrahlung mit 1 Gy konnte nicht ausgewertet werden, da die Signale im Western Blot zu schwach waren und nach Subtraktion vom Hintergrund keine Banden-Intensitäten messbar waren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.9 A-H dargestellt.

In der Western Blot-Analyse konnten die Daten der 2D DIGE Analyse, bis auf die Herunterregulierung von MCM 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy in der Linie GM03323(+), bestätigt werden.

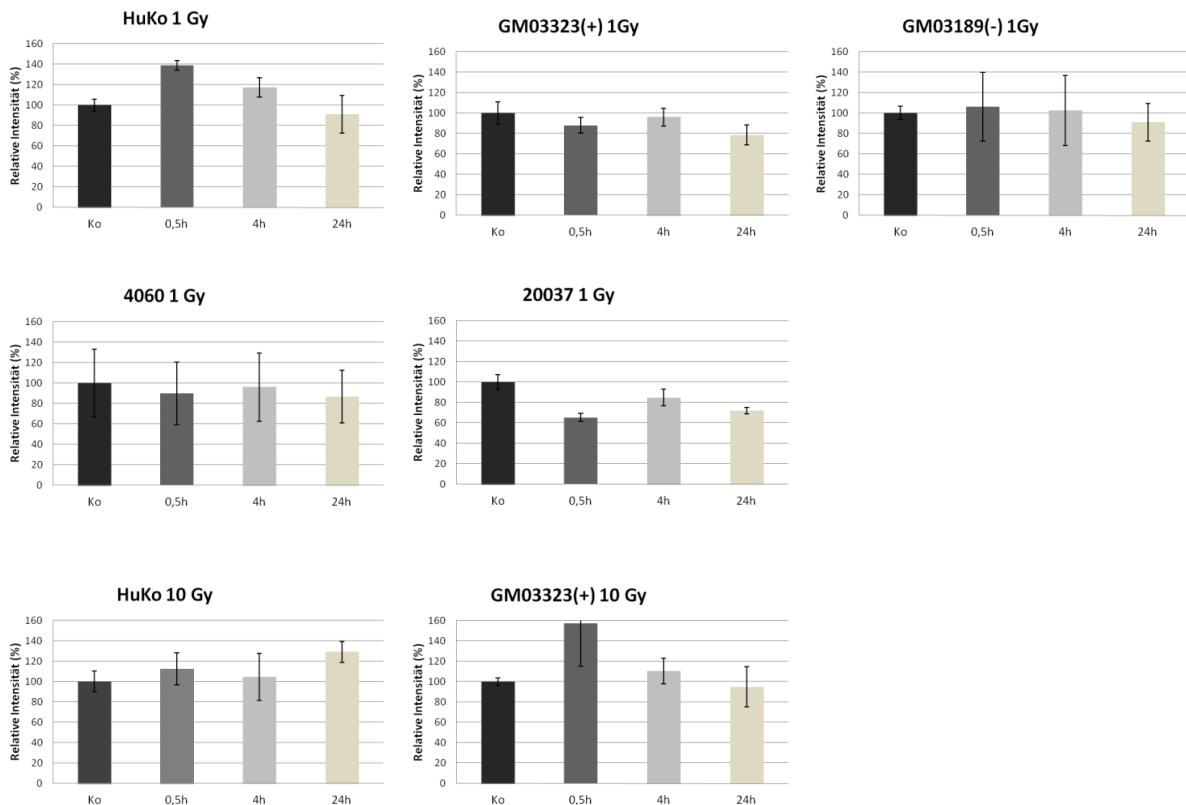
3.9.A 4060-200 10Gy MCM7



Regulationsfaktor	Kontrolle	0,5 h	4 h	24 h
Western Blot	1,0 ± 0,001	-1,26 ± 0,001	-1,21 ± 0,002	-1,37 ± 0,01
DIGE Analyse	1,0	-1,07	-1,09	-1,28

Abbildung 3.9 A: Western Blot der MCM7 Expression in der LUCY Linie 4060 im Vergleich mit der MCM7 Expression der 2D DIGE Analyse nach Bestrahlung mit 10 Gy. Pro Spur wurden 30 µg Gesamtzellextrakt aufgetragen.

3.9.B



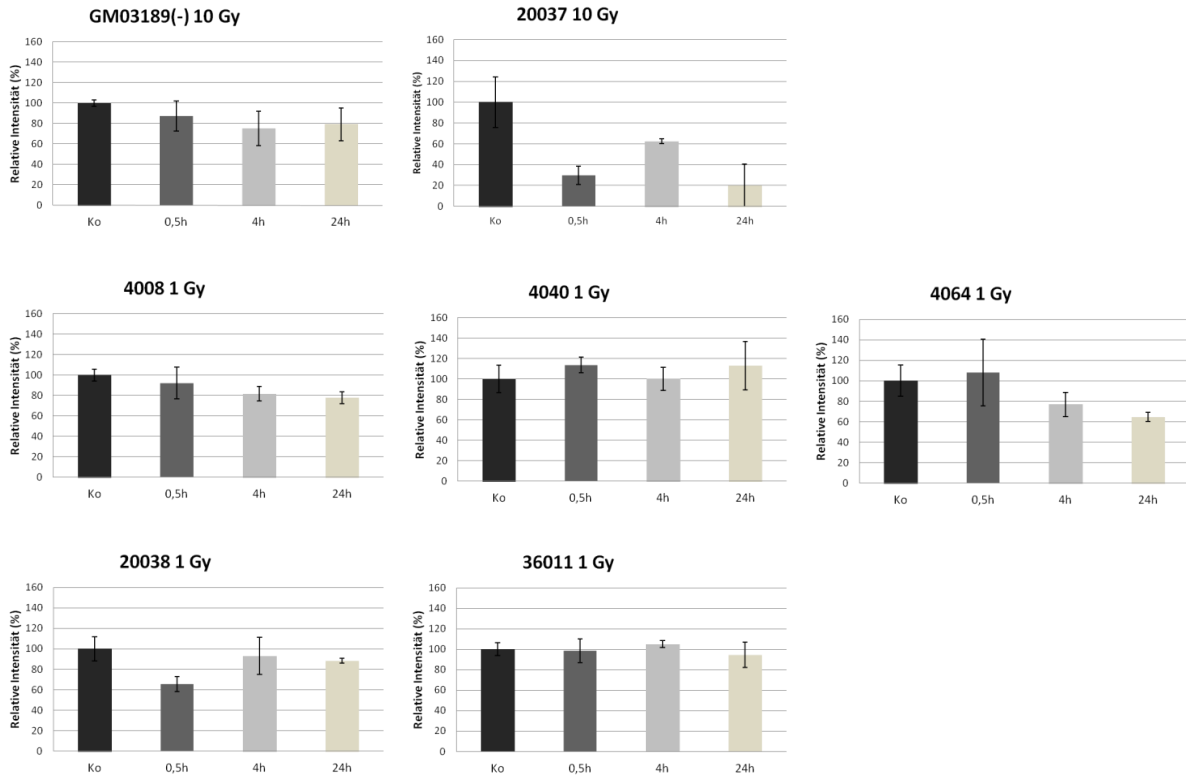
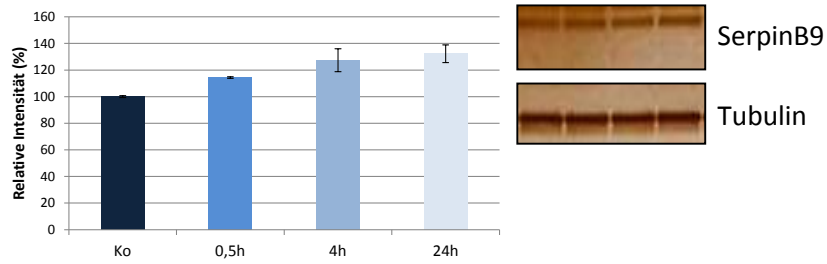


Abbildung 3.9 B: Western Blots der MCM7 Expression in LUCY Linien mit unterschiedlicher Strahlenempfindlichkeit nach Bestrahlung mit 1 Gy und 10 Gy. Es wurden pro Spur 30 µg Gesamtzellextrakt aufgetragen.

MCM7 ist in der Linie 20037 nach Bestrahlung sowohl mit 1 Gy, als auch mit 10 Gy dereguliert, wurde jedoch in der 2D-DIGE Analyse nicht erfasst, da der zugehörige Spot auf den Gelen nur schwach detektierbar war. MCM7 könnte in dieser Linie zu niedrig abundant sein, um bei der Auflösung über einen pH-Bereich 3-10 detektiert werden zu können.

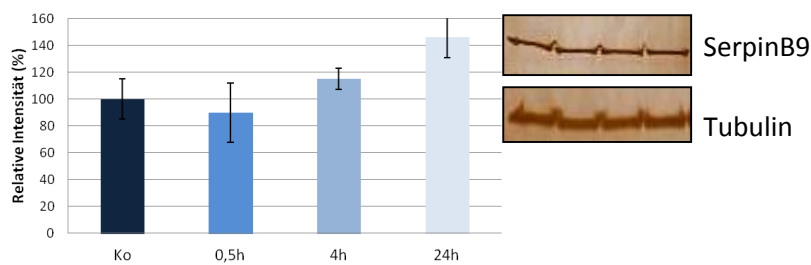
Die MCM7-Expression war in allen analysierten Zelllinien sehr heterogen. Für Zelllinien mit ähnlichem, strahlenempfindlichem Phänotyp sind keine Gemeinsamkeiten zu beobachten. Lediglich 24 h nach Bestrahlung ist MCM7 in den normal reagierenden LUCY-Linien 20037 und 4064 stärker herunterreguliert.

3.9.C LCL-HuKo 10Gy Serpin B9



Regulationsfaktor	Kontrolle	0,5 h	4 h	24 h
Western Blot	1,0 ± 0,005	1,14 ± 0,04	1,27 ± 0,06	1,32 ± 0,05
DIGE Analyse	1,0	1,02	1,04	1,27

20037 1 Gy SerpinB9



Regulationsfaktor	Kontrolle	0,5 h	4 h	24 h
Western Blot	1,0 ± 0,1	-1,14 ± 0,2	1,17 ± 0,2	1,44 ± 0,1
DIGE Analyse	1,0	1,02	1,12	1,42

Abbildung 3.9 C: Western Blot der SerpinB9 Expression in den normalen LCLs HuKo und 20037 im Vergleich mit der SerpinB9 Expression der 2D DIGE Analyse nach Bestrahlung mit 10 Gy bzw. 1 Gy. Pro Spur wurden 30 µg Gesamtzellextrakt aufgetragen.

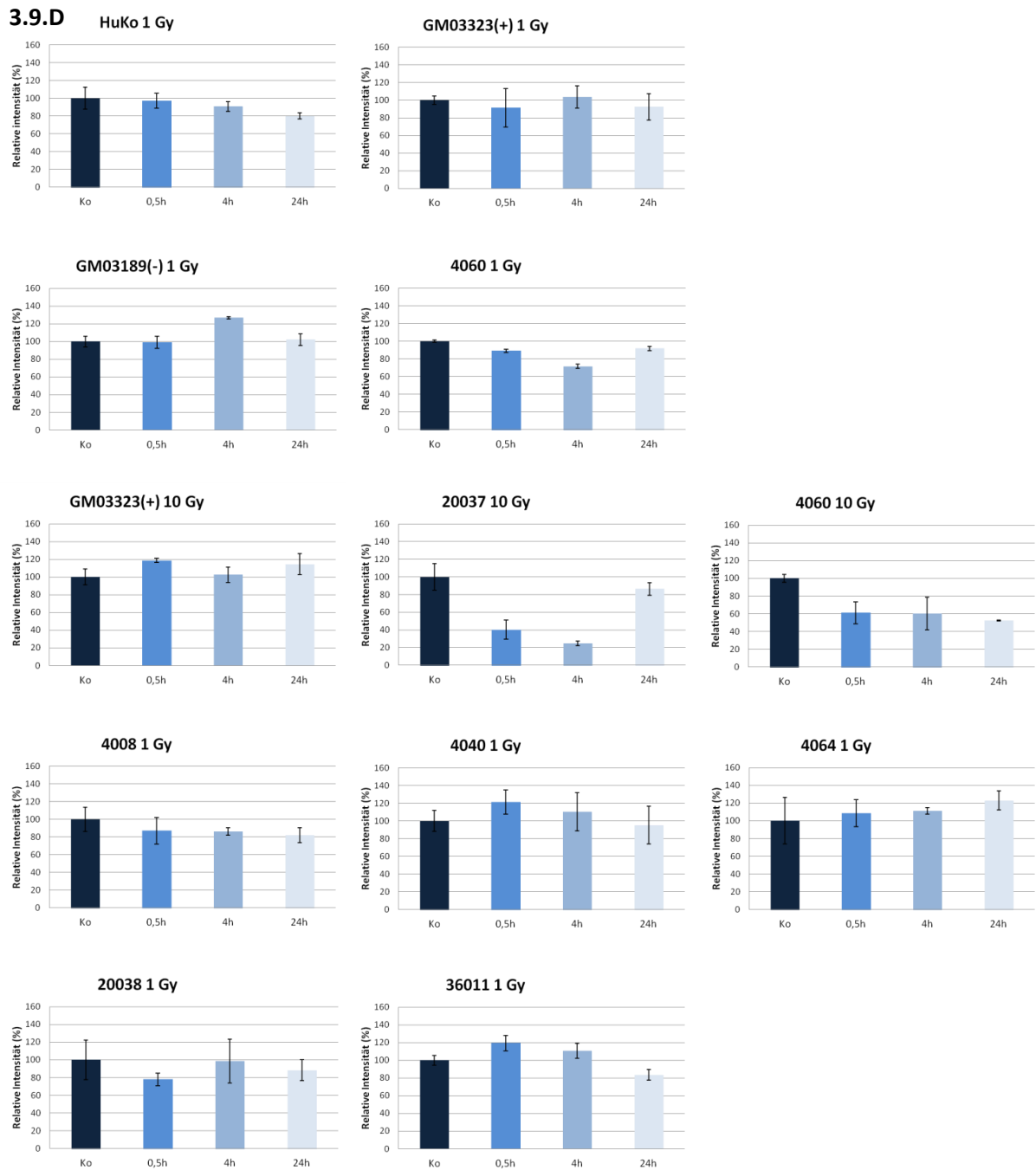


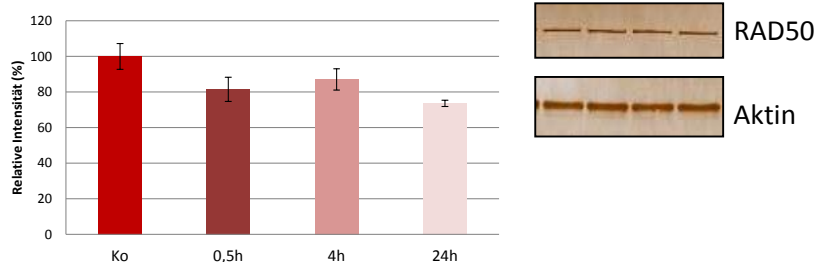
Abbildung 3.9 D: Western Blots der SerpinB9 Expression in LUCY Linien mit unterschiedlicher Strahlenempfindlichkeit nach Bestrahlung mit 1 Gy und 10 Gy. Für die Validierung wurden pro Spur 30 µg Gesamtzellextrakt aufgetragen.

Nach Bestrahlung mit 10 Gy ist die SerpinB9-Expression in der ATM-defizienten Linie GM03189(-) so gering, dass eine Auswertung der Signale nicht möglich war.

Die interindividuelle Heterogenität der Proteinexpression zeigt sich auch bei der Analyse der SerpinB9 Expression. Es gibt abermals kein gemeinsames Muster für Zelllinien mit ähnlichem

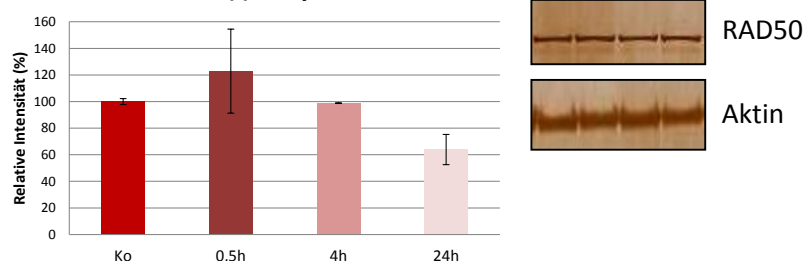
Phänotyp. Der größte Unterschied ist 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy zwischen der sensitiven Linie 4060 und der normalen Linie 20037 zu beobachten. In beiden Linien wurde MCM7 nach 0,5 h und 4 h herunterreguliert. Nach 24 h ist die MCM7 Expression in der Linie 4060 um einen Faktor - 1,5 signifikant geringer, als in der Kontrolle. Im Vergleich dazu ist der Expressionsstatus in der Linie 20037 nach 24 h wieder fast entsprechend der unbestrahlten Kontrolle.

3.9.E 4060-200 1Gy Rad50



Regulationsfaktor	Kontrolle	0,5 h	4 h	24 h
Western Blot	1,0 ± 0,02	-1,18 ± 0,02	-1,13 ± 0,02	-1,27 ± 0,006
DIGE Analyse	1,0	-1,12	-1,12	-1,37

GM03189(-) 10Gy Rad50



Regulationsfaktor	Kontrolle	0,5 h	4 h	24 h
Western Blot	1,0 ± 0,02	1,23 ± 0,3	-1,02 ± 0,002	-1,36 ± 0,1
DIGE Analyse	1,0	1,02	-1,22	-1,30

Abbildung 3.9 E: Western Blot der RAD50 Expression in den sensitiven LCLs 4060 und GM03189(-) im Vergleich mit der RAD50 Expression der 2D DIGE Analyse nach Bestrahlung mit 1 Gy bzw. 10 Gy. Pro Spur wurden 30 µg Gesamtzellextrakt aufgetragen.

3.9.F

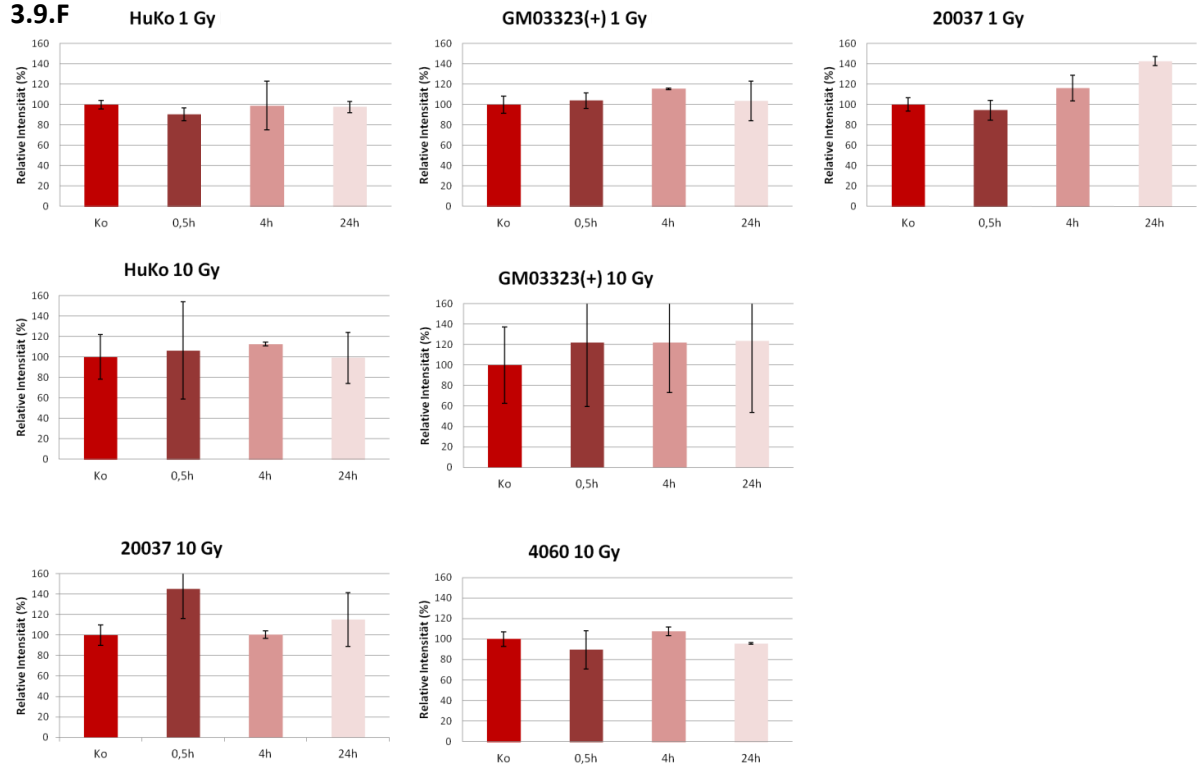
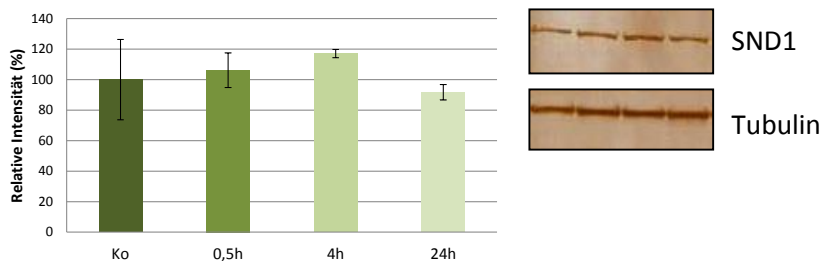


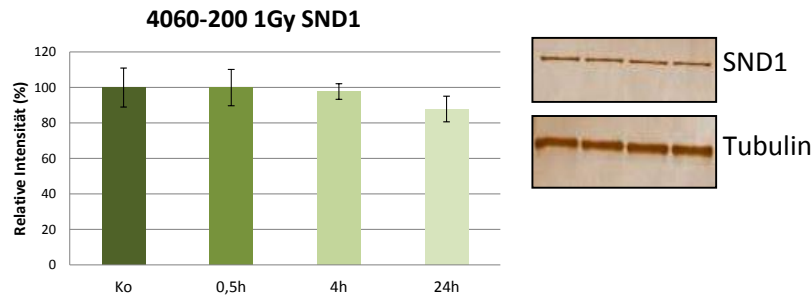
Abbildung 3.9 F: Western Blots der RAD50 Expression in den LUCY Linien der 2D DIGE Analyse nach Bestrahlung mit 1 Gy und 10 Gy. Pro Spur wurden 30 µg Gesamtzellextrakt aufgetragen.

RAD50 konnte ausschließlich in den sensitiven Linien als signifikant dereguliert beobachtet werden. Die im Western Blot generierten Regulationsfaktoren stimmen sehr genau mit denen der 2D DIGE Analyse überein.

3.9.G 20037-200 10Gy SND1



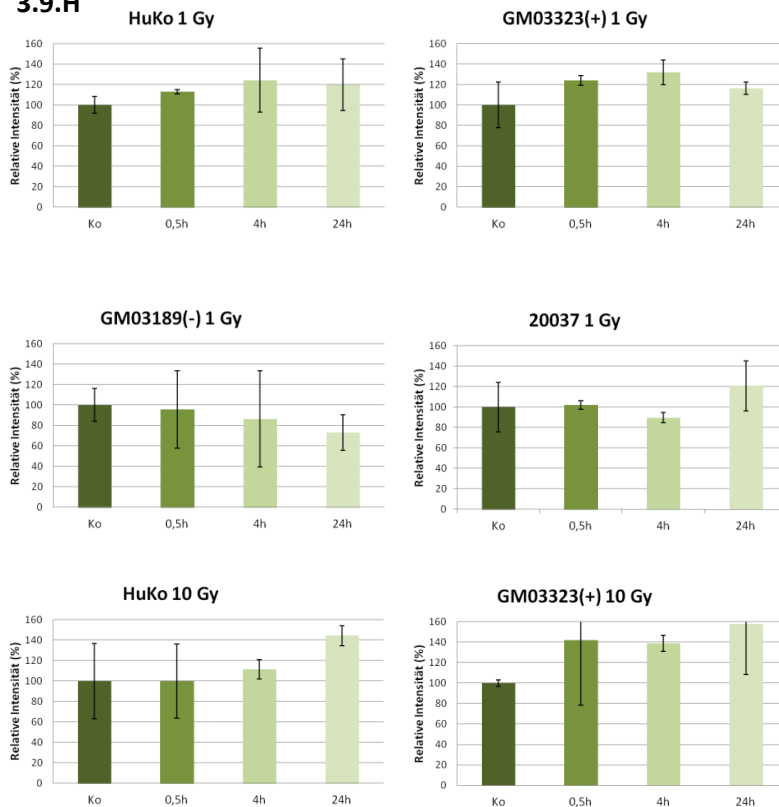
Regulationsfaktor	Kontrolle	0,5 h	4 h	24 h
Western Blot	1,0 ± 0,2	1,06 ± 0,1	1,17 ± 0,02	-1,10 ± 0,02
DIGE Analyse	1,0	1,01	1,17	-1,13



Regulationsfaktor	Kontrolle	0,5 h	4 h	24 h
Western Blot	1,0 ± 0,04	1,0 ± 0,03	-1,03 ± 0,01	-1,12 ± 0,02
DIGE Analyse	1,0	-1,04	-1,07	-1,17

Abbildung 3.9 G: Western Blot der SND1 Expression in den Lucy Linien 20037 und 4060 im Vergleich mit der SND1 Expression der 2D DIGE Analyse nach Bestrahlung mit 10 Gy bzw. 1 Gy. Pro Spur wurden 30 µg Gesamtzellextrakt aufgetragen.

3.9.H



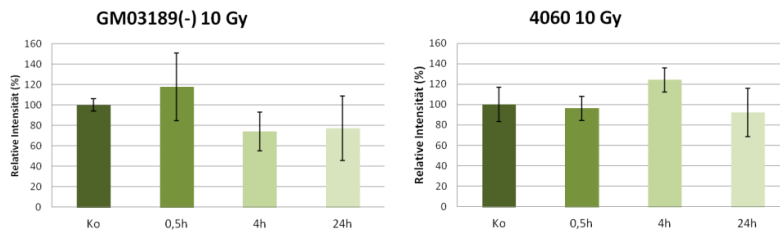


Abbildung 3.9 H: Western Blots der SND1 Expression in den LUCY Linien der 2D DIGE Analyse nach Bestrahlung mit 1 Gy und 10 Gy. Pro Spur wurden 30 µg Gesamtzellextrakt aufgetragen.

Die SND1 Expression nach Bestrahlung ist ebenfalls sehr heterogen und ist für keine Linie, Dosis und Zeitpunkt signifikant verändert. Auch hier ist kein Zusammenhang der differentiellen Proteinexpression zur Strahlenempfindlichkeit feststellbar.

Die Western Blot-Analyse zeigt, dass die Expressionsänderung der gewählten Proteine MCM7, SerpinB9, RAD50 und SND1 interindividuell stark variiert. Es sind keine gemeinsamen Expressionsmuster erkennbar. Die Heterogenität der Strahlenantwort unterschiedlicher Zelllinien, die nach der 2D DIGE Analyse beobachtet wurde, konnte im Western Blot für die ausgewählten Proteine bestätigt werden.

Diese Beobachtung verifiziert die aufgestellte Hypothese, und deutet stark darauf hin, dass die interindividuelle Variabilität in der Strahlenantwort, im Vergleich zur intraindividuellen Variabilität, sehr hoch ist.

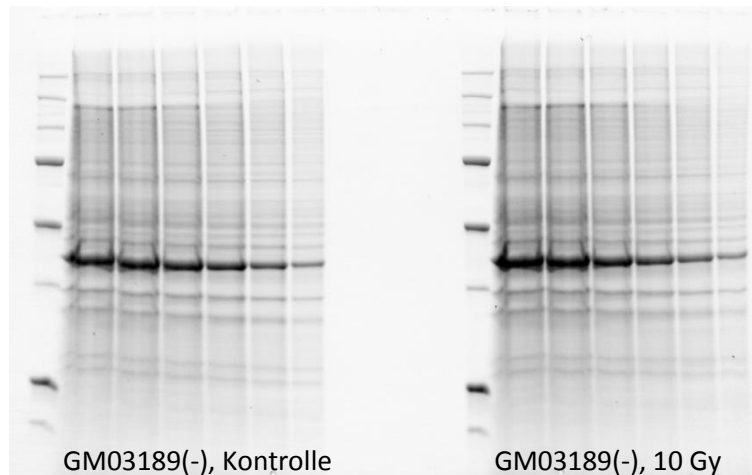
3.7.2 Validierung der Regulation von RAD50 mit der Stain-Free-Methode (BioRad)

Der Western Blot ist eine gut etablierte Methode, um den relativen Gehalt eines spezifischen Proteins in komplexen biologischen Proben zu messen. Die Analyse der differentiellen Proteinexpression durch Quantifizierung und anschließenden Vergleich der Western Blot Signale benötigt normalerweise einen verlässlichen Referenzwert. Als Referenz dient meist das Signal eines house-keeping Proteins, wie Aktin, Tubulin oder GAPDH. Die Signalstärke dieser Proteine dient zur Normalisierung der Signale. Diese Methode ist weniger verlässlich und robust als nach dem Blotten die gesamte Proteinsignalintensität für die Normalisierung zu erfassen, da die house-

keeping Proteine ebenfalls reguliert werden. Hier wurde für die Western Blot-Analyse die Stain-Free™(SF)-Technologie von BioRad verwendet. Diese Methode ermöglicht, die gesamte Signalintensität zu erfassen (Gürtler et al. 2013).

Der Gesamtproteinextrakt der Linie GM03189(-) wurde mit Hilfe eines TGX any kD Criterion Stain-Free 1D SDS Gels aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose Membran geblottet. Um zu überprüfen ob das Signal linear ist, wurde eine absteigende Konzentrationsreihe (60 µg, 50 µg, 40 µg, 30 µg, 20 µg und 10 µg) aufgetragen. Die Datenerhebung erfolgte mit der Software ImageLab (BioRad) (Abb.: 3.10 A/B). Die Ergebnisse der Analyse für jede einzelne Spur sind in Tabelle 3.16 dargestellt. Zur Analyse wurde die unbestrahlte Kontrolle und das Lysat der 10 Gy bestrahlten Zellen zum Zeitpunkt 24 h post-Bestrahlung gewählt.

A



B

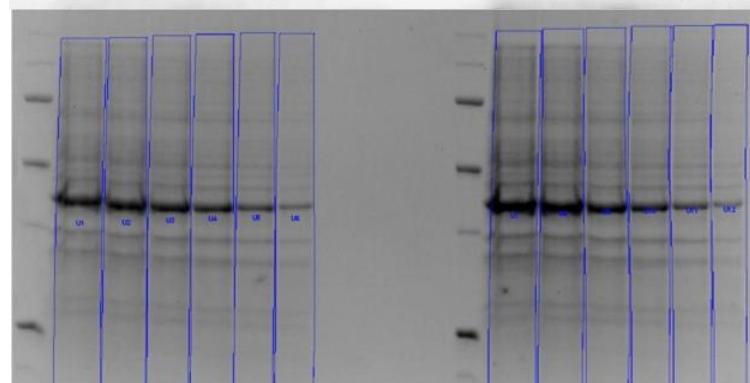


Abbildung 3.10 A/B: Stain-Free-Gel und zugehörige Nitrozellulose-Membran mit dem Gesamt-Proteingehalt der sensitiven Kontrolle GM03189(-). Abbildung A zeigt die Auftrennung der Proteine im TGX any kD Criterion Stain-Free Gel der Linie GM03189(-). Auf der Membran (B) ist der Proteingehalt nach dem Blotten mit Stain-Free Methode visualisiert. Die Banden auf der linken Seite zeigen die Konzentrationsreihe der Kontrolle, die Banden rechts zeigen die Intensitäten der Konzentrationsreihe 24 h nach Bestrahlung. Die Intensität wurde mit der ImageLab Software für jede Spur erfasst und die Ergebnisse der Membran-Intensitäten sind in Tabelle 3.18 zusammengefasst.

Tabelle 3.18: Gesamtintensität des Stain-Free Signals vor und nach Bestrahlung. Die Intensitäten wurden für jede Spur separat erfasst.

µg Protein pro Spur	Kontrolle, Gesamt-Intensität (Volumen)	10 Gy 24 h, Gesamt-Intensität (Volumen)
60	4.701.076,13	6.255.774,17
50	3.557.265,66	4.873.084,32
40	3.173.121,57	3.277.981,75
30	2.467.646,94	2.495.618,87
20	1.928.584,80	1.921.529,70
10	1.026.412,45	1.418.332,47

Um die Linearität des Signals zu visualisieren, wurden die erfassten Gesamtintensitäten sowohl der Kontrolle, als auch der bestrahlten Probe in Abbildung 3.11 dargestellt.

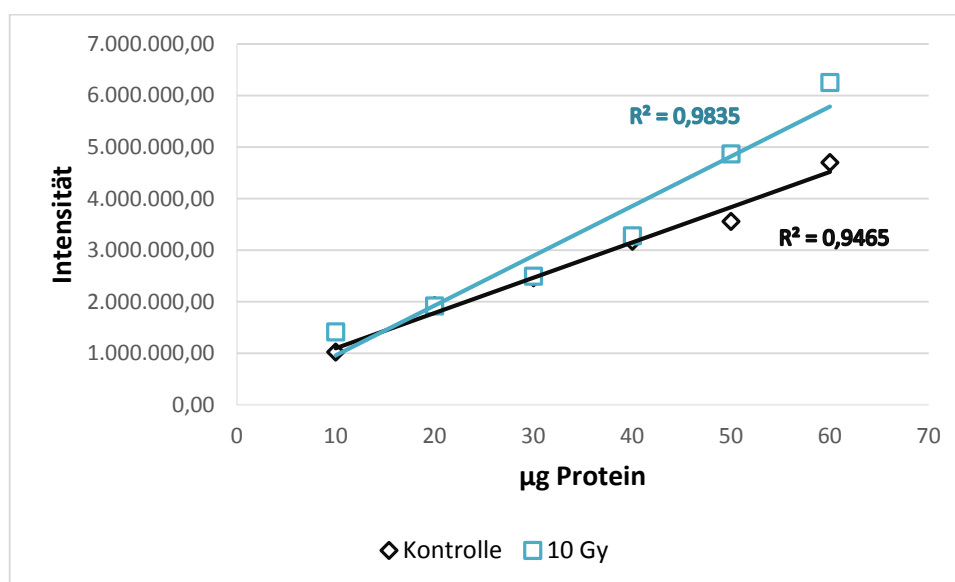


Abbildung 3.11: Linearität der Stain-Free Technologie auf der Blot Membran: Zelllysate [Kontrolle (schwarz) und 10 Gy (blau)] (10 – 60 µg Gesamtprotein pro Spur) wurden über ein TGX any kD Criterion Stain-Free 1D SDS Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose Membran geblotted. Die Linearität wird durch das hohe Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,95$ (Kontrolle) und $R^2 = 0,98$ (10 Gy) bestätigt.

Um die Expression von RAD50 zu analysieren, wurde die Nitrozellulose Membran mit einem monoklonalen Antikörper gegen das DNA Reparaturprotein RAD50 (Abcam) inkubiert und die Chemilumineszenz Signale mit dem Kamerasystem ChemiDoc MP (BioRad) erfasst. Abbildung 3.12 A zeigt die Chemilumineszenz Signale von RAD50. In Abbildung 3.12 B ist die

Auswertung der Signalstärke mit der Software QuantityOne (BioRad) gezeigt. Die Ergebnisse der Auswertung der RAD50 Signale sind in Tabelle 3.19 aufgeführt.



Abbildung 3.12 A/B: Immunchemische Färbung des DNA-Reparaturproteins RAD50 in der sensitiven Linie GM03189(-). A zeigt die Signale der Konzentrationsreihe (60 µg – 10 µg) nach Visualisierung durch Chemilumineszenz links sind die Signale der unbestrahlten Kontrolle, rechts die der bestrahlten Probe aufgetragen. B zeigt die Erfassung der Banden-Intensität mit der Software QuantityOne. Für die Datenerhebung wurde das *Contour-Tool* verwendet.

Tabelle 3.19: Intensitäten der RAD50-Signale vor und nach Bestrahlung in der sensitiven Linie GM03189(-).

µg Protein pro Spur	RAD50 Signal, Kontrolle	RAD50 Signal, bestrahlt	Faktor Analyse
60	244.722.793	234.706.815	0,96
50	215.822.675	207.491.076	0,96
40	219.691.766	175.543.804	0,80
30	195.271.248	132.855.971	0,68
20	142.787.600	98.210.275	0,69
10	112.486.805	69.545.925	0,62
			0,74* median

*Vergleich der Verdünnungsreihe: Faktor ~ 0,7 → Regulationsfaktor -1,3

Um den Regulationsfaktor von RAD50 in der Linie GM03189(-) 24 h nach Bestrahlung zu erfassen, müssen die RAD50 Signalintensitäten (Tabelle 3.19) mit den Stain-Free Daten (Tabelle 3.18) normalisiert werden. Der Regulationsfaktor von RAD50 der 2D DIGE Analyse in der Linie GM03189(-) beträgt -1,3. Nach Normalisierung der Signale mit der Stain-Free Methode wurde ein Deregulationsfaktor von ~ 0,7 berechnet (Tabelle 3.20). Dieser Faktor bestätigt die Daten der 2D DIGE Analyse.

Tabelle 3.20: Normalisierung der RAD50 Signalintensitäten aus Tabelle 3.19 mit den Stain-Free Daten aus Tabelle 3.18.

µg Prot. pro Spur	Kontrolle, Gesamt- Spurintensität (Volumen)	RAD50 Signal, Kontrolle	Normalisierung RAD50 (Kontrolle) gegen SF	bestrahlt, Gesamt- Spurintensität (Volumen)	RAD50 Signal, bestrahlt	Normalisierung RAD50 (bestrahlt) gegen SF
60	4701076,13	244722793	52,06	6255774,17	234706815	37,52
50	3557265,66	215822675	60,67	4873084,32	207491076	42,58
40	3173121,57	219691766	69,24	3277981,75	175543804	53,55
30	2467646,94	195271248	79,13	2495618,87	132855971	53,24
20	1928584,80	142787600	74,04	1921529,70	98210275	51,11
10	1026412,45	112486805	109,59	1418332,47	69545925	49,03
			71,64			
			median			50,07
						median

50,07 dividiert durch 71,64 = 0,70 → Regulationsfaktor -1,3

3.8 Analyse der miRNA-Expression nach ionisierender Strahlung

miRNAs sind ein wichtiger Bestandteil der Regulation der Strahlenantwort. Um festzustellen, welche spezifischen miRNAs an der Strahlenreaktion bei Zelllinien mitwirken, wurde eine miRNA-Expressionsanalyse der 2 unterschiedlich strahlenempfindlichen lymphoblastoiden Kontrolllinien GM03189(-) und GM03323(+), sowie von den unterschiedlich strahlenempfindlichen LUCY-Linien 4060 (sensitiv) und 20037 (normal) durchgeführt. Dies wurde mittels TaqMan Low Density Arrays durchgeführt, die eine gleichzeitige Detektion von 378 humanen miRNAs erlauben. Die Messung der miRNAs erfolgte nach 4 h und 24 h im Anschluss an eine Bestrahlung mit 10 Gy. Anschließend wurden die veränderten miRNAs zu den angegebenen Zeitpunkten im Vergleich zur Kontrolle analysiert. Hierfür wurden die *Crossing points* (= C_t) zuerst mittels einer endogenen Kontrolle (U6), die sich ebenfalls auf dem Array befand, normalisiert. U6 ist eine kleine snoRNA, die im Gegensatz zu miRNAs nicht über die Proteine Dicer und Argonaut2 prozessiert wird. Anschließend wurden die normalisierten Werte jeder einzelnen miRNA mit den normalisierten Werten der passenden Kontrolle verrechnet. MiRNAs wurden als signifikant verändert erachtet, wenn sie eine Regulation $< 0,5$ oder > 2 im Vergleich zu den unbestrahlten Proben aufwiesen. Die ermittelten Daten der Kontrolllinien GM03323(+) und GM03189(-) ergeben sich aus zwei unabhängigen Versuchen mit 2 biologischen Replikaten, während die Analyse der miRNA Expressionsänderung der Linien 4060 und 20037 mit den Daten von einem einzigen miRNA-Array durchgeführt wurde.

In der Tabelle 6 A-D im Anhang sind alle miRNAs, die in den 4 analysierten Zelllinien 4 h und 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy signifikant reguliert waren, aufgeführt.

In Abbildung 3.13 sind alle miRNAs aufgeführt, die in der Linie GM03323(+) 4 h nach der Bestrahlung mit 10 Gy eine signifikante Expressionsänderung im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle aufwiesen. Zu diesem Zeitpunkt zeigten 21 miRNAs eine signifikante Deregulierung, wobei die Expression von 15 miRNAs herunterreguliert (grüne Balken) und von 6 miRNAs erhöht war (rote Balken).

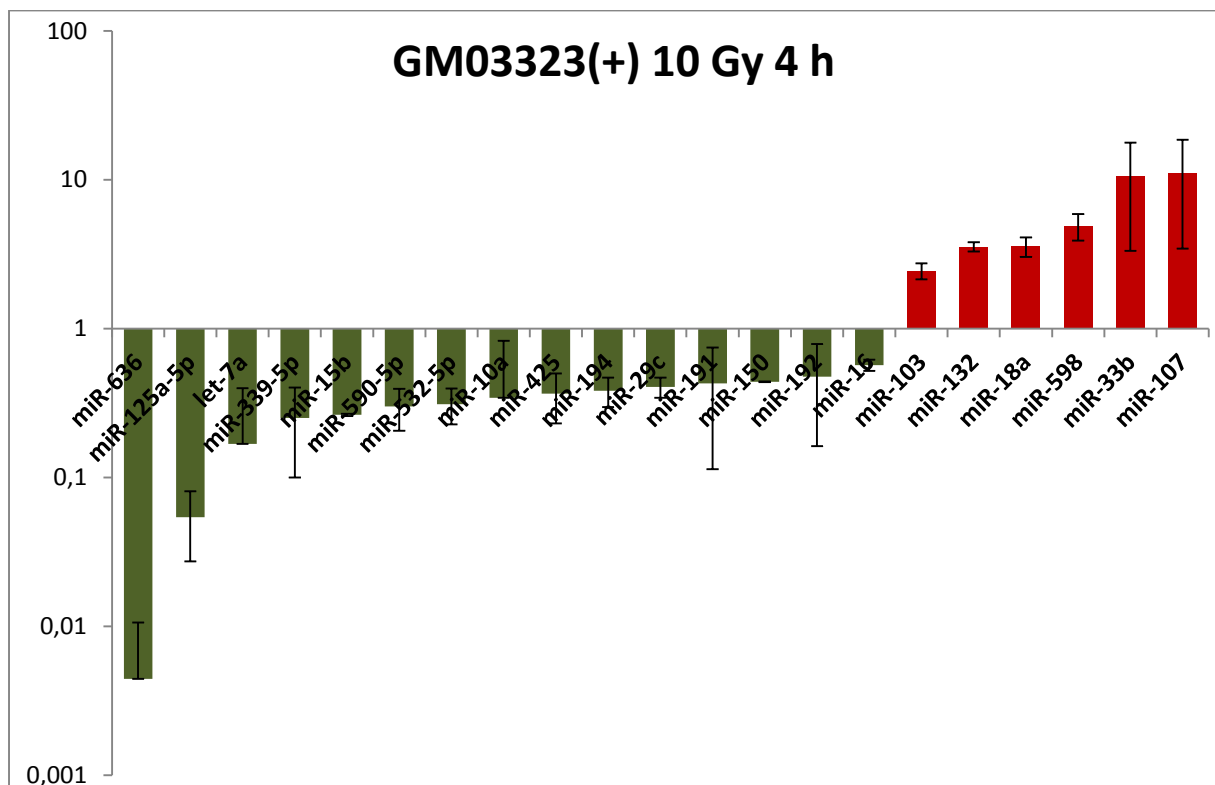


Abbildung 3.13: MiRNA Expressionsprofil der Strahlenantwort in der Linie GM03323(+) 4 h post-Bestrahlung. Differentiell exprimierte miRNAs wurden 4 h nach Bestrahlung mit 10 Gy analysiert ($p < 0,05$; 0,5 > -fache Veränderung > 2,0). Hochregulierte miRNAs sind rot, herunterregulierte miRNAs grün gekennzeichnet.

24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy sank die Anzahl der differentiell exprimierten miRNAs mit einer signifikanten Veränderung ($< 0,5$ oder > 2) in ihrer Expression im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen auf 15. Hiervon waren 7 miRNAs hochreguliert (rote Balken), während 8 miRNAs eine Herunterregulierung zeigten (Abb. 3.14)

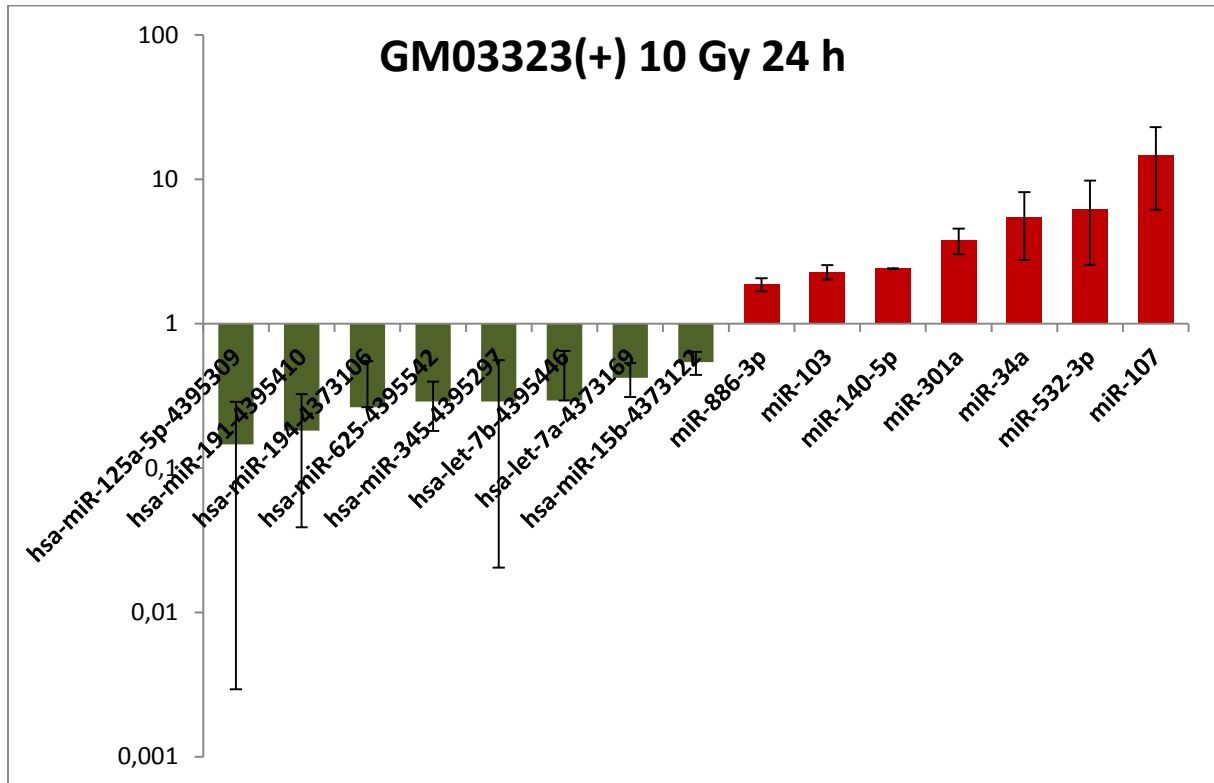


Abbildung 3.14: MiRNA Expressionsprofil 24 h nach 10 Gy ionisierender Strahlung in der Linie GM03323(+). Nach 10 Gy Bestrahlung wurden alle differentiell exprimierten miRNAs nach 24 h im Vergleich zu den unbestrahlten Proben untersucht ($p < 0,05$, $0,5 >$ -fache Veränderung $> 2,0$). Im Diagramm werden höher exprimierte miRNAs rot, vermindert exprimierte miRNAs grün dargestellt.

Zu den untersuchten Zeitpunkten wurden sowohl hoch-, als auch herunterregulierte miRNAs beobachtet, was eine Erniedrigung der Genexpression von Zielproteinen durch die Hochregulierung der miRNA Expression als auch eine Hochregulierung der Zielproteine durch eine Verringerung der miRNA Expression bedingt. Ein Vergleich der deregulierten miRNAs an den verschiedenen Zeitpunkten zeigt nur wenige Überlappungen. Nur 2 miRNAs (miR-103, miR-107) sind zu beiden Zeitpunkten nach Bestrahlung hochreguliert, zwischen den vermindert exprimierten miRNAs zeigt sich nach Bestrahlung zu den 2 untersuchten Zeitpunkten 4 h und 24 h keine Überlappung (Abb.: 3.115).

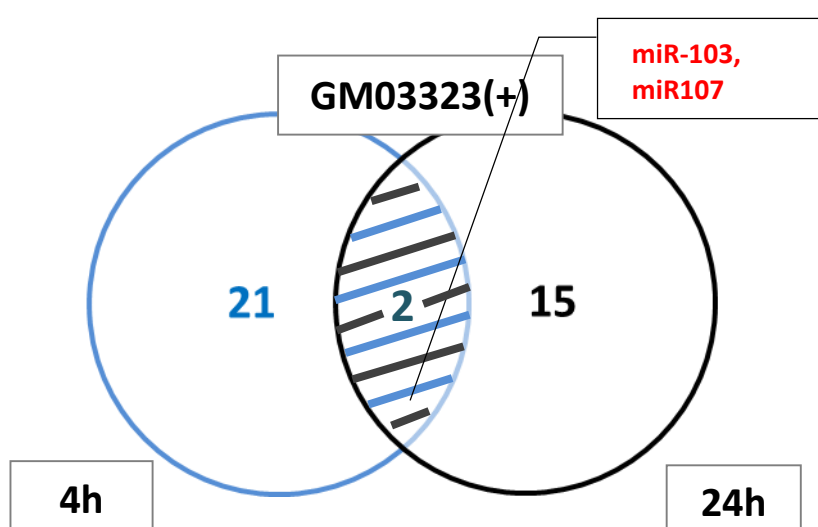


Abbildung 3.15: Venn Diagramm der differentiell exprimierten miRNAs 4 h und 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy in der resistenten Kontrolllinie GM03323(+). Das Diagramm zeigt die Anzahl der differentiell exprimierten miRNAs nach 4 h (blau) und 24 h (schwarz) nach Bestrahlung mit 10 Gy. Die Schnittmenge (schraffierter Bereich) umfasst die miRNAs, die zu beiden Zeitpunkten signifikant verändert sind. Die zu beiden Zeitpunkten gemeinsam hochregulierten miRNAs sind rot gekennzeichnet.

4 h nach Bestrahlung waren 21 miRNAs differentiell exprimiert. Nach 24 h wurden 15 miRNAs dereguliert, wobei zu beiden Zeitpunkten nur 2 miRNAs identisch waren. Beide miRNAs sind nach Bestrahlung vermehrt exprimiert. Die wenigen, zu beiden Zeitpunkten gemeinsam differentiell exprimierten miRNAs, lassen auf unterschiedliche und zeitabhängige regulatorische Funktionen der miRNAs innerhalb der Strahlenantwort schließen.

Auch in der strahlensensitiven Kontrolllinie GM03189(-) wurde die miRNA Expression 4 h und 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy mittels TaqMan *Low Density Arrays* gemessen. Anschließend wurden die veränderten miRNAs zu den angegebenen Zeitpunkten im Vergleich zur Kontrolle analysiert.

In Abbildung 3.16 sind alle miRNAs aufgeführt, die 4 h nach der Bestrahlung eine signifikante Expressionsänderung $< 0,5$ oder > 2 im Vergleich zu den unbestrahlten Proben aufwiesen. 10 miRNAs zeigen nach 10 Gy Bestrahlung eine signifikante Deregulierung auf. Von diesen veränderten miRNAs waren 6 miRNAs herunterreguliert (grüne Balken) und 4 miRNAs signifikant erhöht (rote Balken).

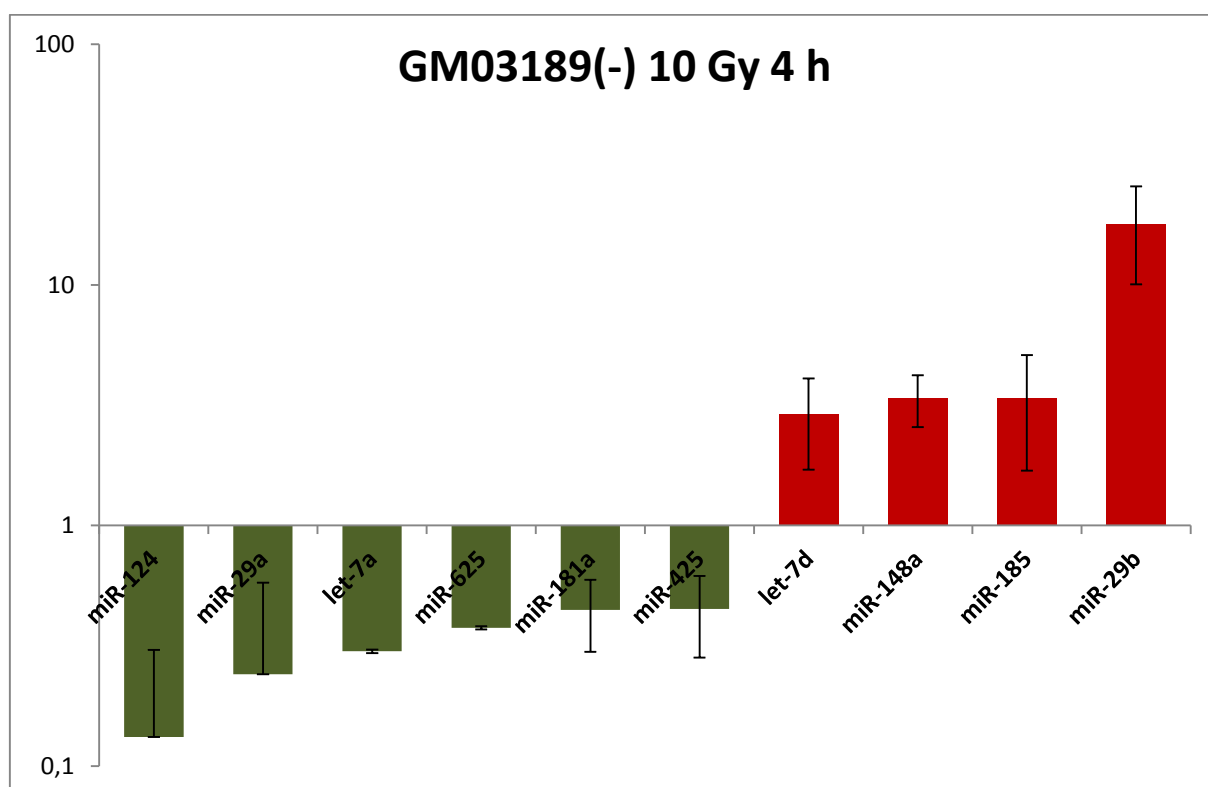


Abbildung 3.16: MiRNA Expressionsprofil der Strahlenantwort 4 h nach ionisierender Strahlung in der Linie GM03189(-). Differenziell exprimierte miRNAs wurden 4 h nach Bestrahlung mit 10 Gy in der strahlensensitiven ATM-defizienten Linie GM03189(-) bestimmt ($p < 0,05$, 0,5 -fache Veränderung $> 2,0$). Hochregulierte miRNAs sind rot, herunterregulierte miRNAs sind grün gekennzeichnet.

24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy waren ebenfalls 10 miRNAs signifikant ($< 0,5$ oder > 2) im Vergleich zu der unbestrahlten Kontrollen reguliert. Wie aus Abbildung 3.17 ersichtlich, waren hiervon 7 miRNAs herunterreguliert und (grüne Balken) 3 miRNAs hochreguliert (rote Balken).

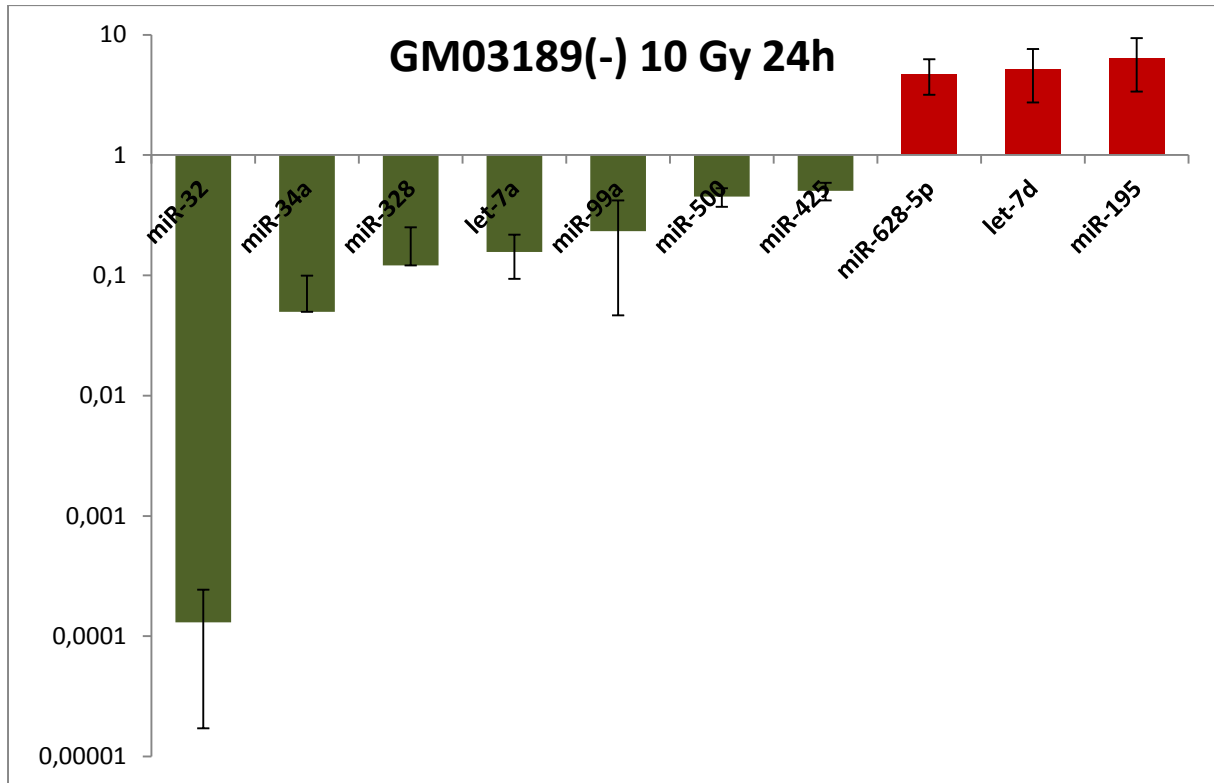


Abbildung 3.17: MiRNA Expressionsprofil der Strahlenantwort 24 h nach ionisierender Strahlung in der Linie GM03189(-). Die Graphik zeigt alle differentiell exprimierten miRNAs 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy ($p < 0,05$, $0,5 > \text{-fache Veränderung} > 2,0$). Hochregulierte miRNAs sind rot, herunterregulierte miRNAs grün dargestellt.

Die strahlensensitive Linie GM03189(-) zeigt, ähnlich wie die Linie GM03323(+), nur eine geringe Anzahl miRNAs die zu beiden Zeitpunkten gemeinsam reguliert sind. Zu beiden Zeitpunkten ist nur die miRNA let-7d hochreguliert, während die beiden miRNAs let-7a und miR-425 vermindert exprimiert waren. Alle anderen miRNAs waren nur zu einem Zeitpunkt differentiell exprimiert (Abb.: 3.18).

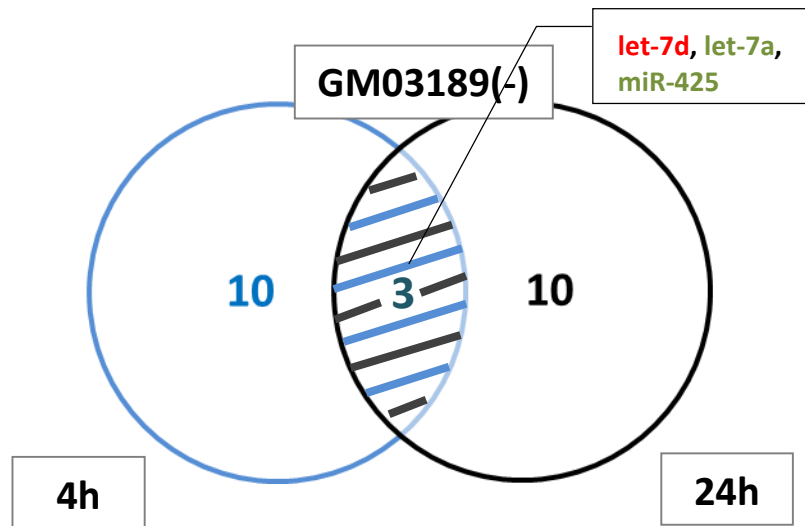


Abbildung 3.18: Venn Diagramm von differentiell exprimierten miRNAs 4 h und 24 h nach Bestrahlung in der strahlensensitiven Linie GM03189(-). Das Diagramm zeigt die Anzahl der differentiell exprimierten miRNAs 4 h (blau) und 24 h (schwarz) nach Bestrahlung mit 10 Gy. Die Schnittmenge (schraffierter Bereich) umfasst die 3 miRNAs, die zu beiden Zeitpunkten signifikant verändert waren. Die hochregulierte mRNA ist rot, die herunterregulierten miRNAs sind grün gekennzeichnet.

Die Messung der miRNA Expressionsänderung in der normalen LUCY-Linie 20037, als auch der sensitiven Linie 4060 erfolgte aufgrund der hohen Kosten mit nur einem TaqMan Low Density Array. Abbildung 3.19 zeigt das Ergebnis der Messung 4 h nach Bestrahlung der Linie 20037 mit 10 Gy. Im Vergleich zur Expressionsanalyse der Kontrolllinien ist hier eine größere Anzahl miRNAs differentiell exprimiert. 24 miRNAs sind nach 4 h herunterreguliert, 12 miRNAs sind post-Bestrahlung hochreguliert.

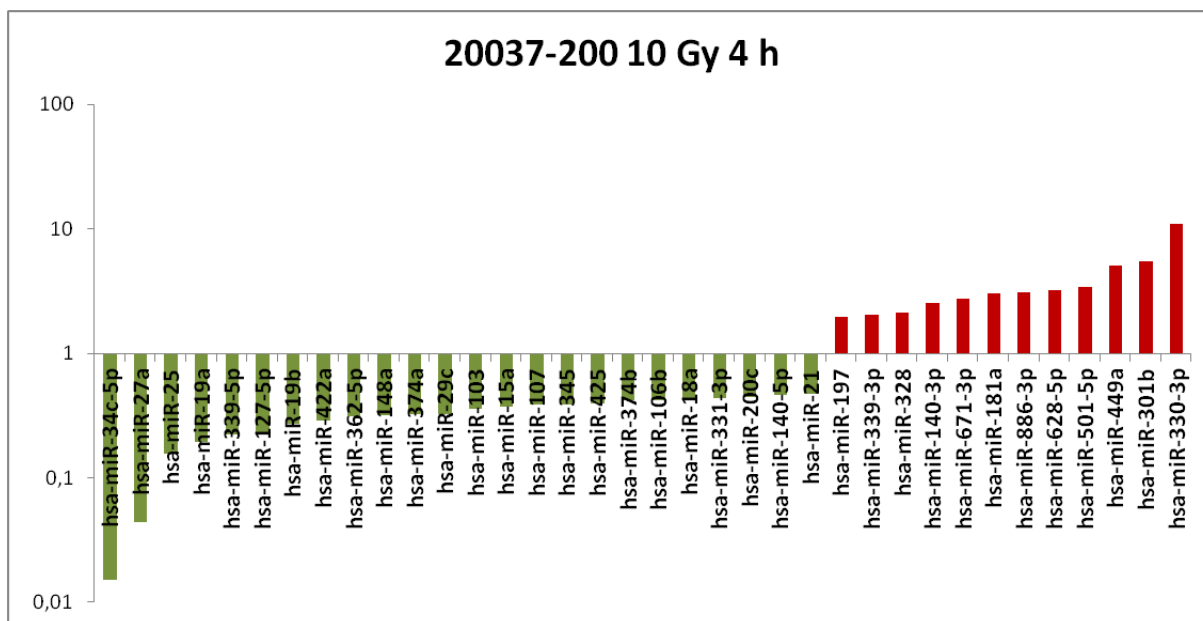


Abbildung 3.19: MiRNA Expressionsprofil der Strahlenantwort 4 h post-Bestrahlung in der resistenten Linie 20037. Die Graphik zeigt alle differentiell exprimierten miRNAs 4 h nach Bestrahlung mit 10 Gy ($p < 0,05$, $0,5 >$ -fache Veränderung $> 2,0$). Hochregulierte miRNAs sind rot, herunterregulierte miRNAs grün dargestellt.

24 h nach Bestrahlung sinkt die Anzahl der herunterregulierten ($< 0,5$) miRNAs in der Linie 20037 auf 10, die Anzahl der hochregulierten (> 2) miRNAs steigt auf 16. Die deregulierten miRNAs sind in Abbildung 3.20 dargestellt. Vermindert exprimierte miRNAs sind grün, vermehrt exprimierte sind rot markiert.

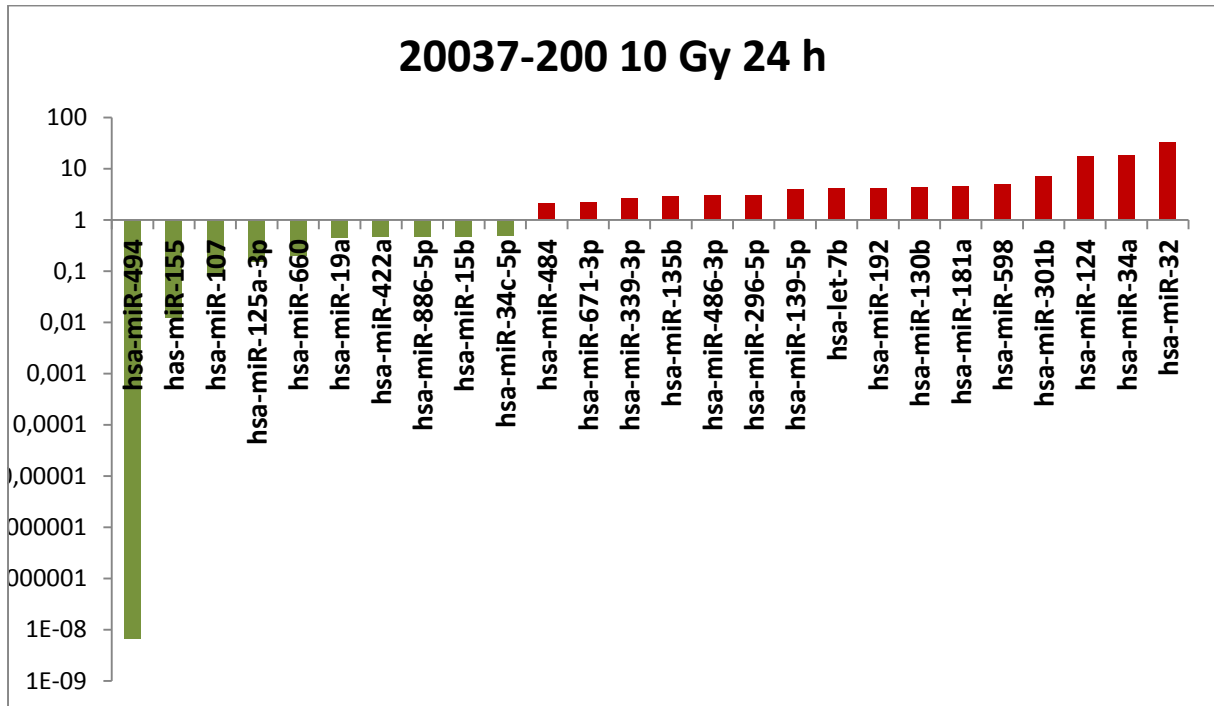


Abbildung 3.20: MiRNA Expressionsprofil der Strahlenantwort 24 h nach 10 Gy Bestrahlung in der Linie 20037. Die Graphik zeigt alle differentiell exprimierten miRNAs 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy ($p < 0,05$, $0,5 >$ -fache Veränderung $> 2,0$). Hochregulierte miRNAs sind rot, herunterregulierte miRNAs grün dargestellt.

Im Vergleich zu den beiden Kontrolllinien, sind in der Linie 20037 zu beiden Zeitpunkten mehr miRNAs gemeinsam reguliert. Dies beruht höchstwahrscheinlich darauf, dass nur ein Array durchgeführt wurde und somit aufgrund der weniger stringenten Kriterien mehr falsch positive Treffer generiert wurden, im Vergleich zu den Kontrolllinien. 4 miRNAs sind sowohl 4 h als auch 24 h nach Bestrahlung im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle herunterreguliert (hsa-miR-107, hsa-miR-19a, hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-422a) und ebenfalls 4 miRNAs zeigen post-Bestrahlung eine erhöhte Expression (hsa-miR-671-3p, hsa-miR-339-3p, hsa-miR-301b, hsa-miR-181a) (Abb.: 3.21).

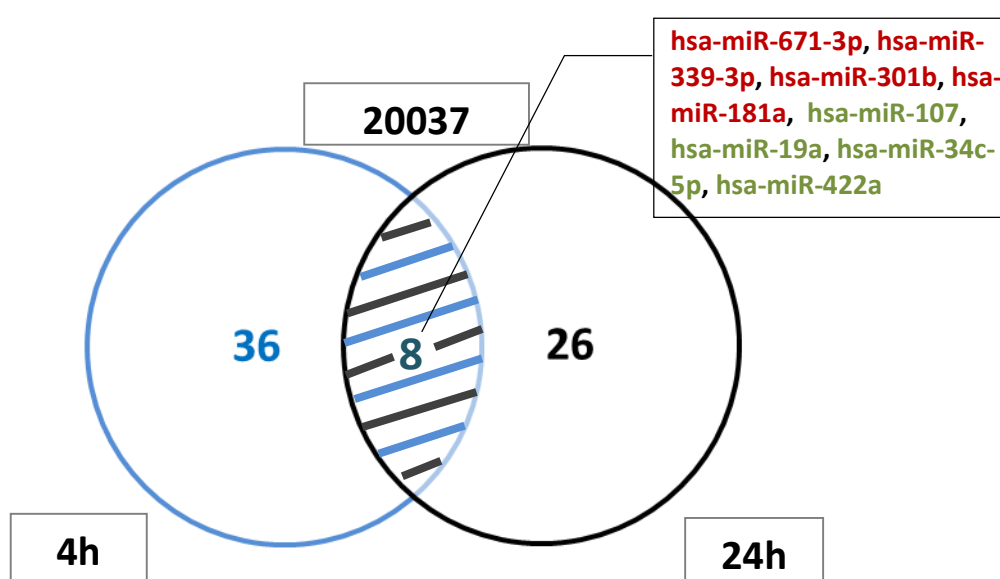


Abbildung 3.21: Venn Diagramm der differentiell exprimierten miRNAs 4 h und 24 h nach Bestrahlung in der strahlenresistenten Linie 20037. Das Diagramm zeigt die Anzahl der differentiell exprimierten miRNAs 4 h (blau) und 24 h (schwarz) nach Bestrahlung mit 10 Gy. Die Schnittmenge (schraffierter Bereich) umfasst alle 8 miRNAs, die zu beiden Zeitpunkten signifikant verändert waren. Die hochregulierten miRNAs sind rot, die herunterregulierten miRNAs grün markiert.

Die Analyse der Unterschiede in der miRNA Expression in der sensitiven Linie 4060 erfolgte wie in der strahlenresistenten LUCY-Linie 20037 nach nur einer Messung mit dem TaqMan Low Density Array. In Abbildung 3.22 ist das Ergebnis der Messung 4 h nach Bestrahlung mit 10 Gy dargestellt. Im Vergleich zur Expressionsanalyse der Kontrolllinien ist hier, wie auch in der Linie 20037 eine größere Anzahl miRNAs differentiell exprimiert. Nach 4 h sind 2 miRNAs herunterreguliert, 17 miRNAs sind post-Bestrahlung hochreguliert.

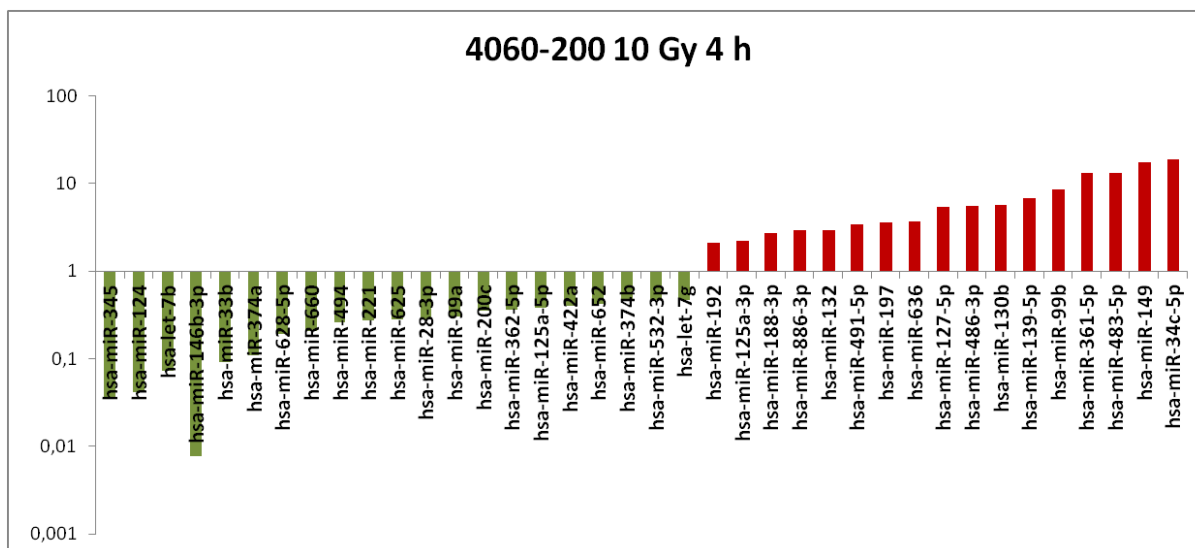


Abbildung 3.22: MiRNA Expressionsprofil der Strahlenantwort 4 h nach 10 Gy Bestrahlung in der sensitiven Linie 4060. Die Graphik zeigt alle differentiell exprimierten miRNAs 4 h nach Bestrahlung mit 10 Gy ($p < 0,05$, $0,5 >$ -fache Veränderung $> 2,0$). Hochregulierte miRNAs sind rot, herunterregulierte miRNAs grün dargestellt.

24 h nach Bestrahlung steigt die Anzahl der herunterregulierten ($< 0,5$) miRNAs in der resistenten Linie 20037 auf 27, die Anzahl der hochregulierten (> 2) miRNAs sinkt auf 15. Die deregulierten miRNAs sind in Abbildung 3.23 dargestellt. Vermindert exprimierte miRNAs sind grün, vermehrt exprimierte rot markiert.

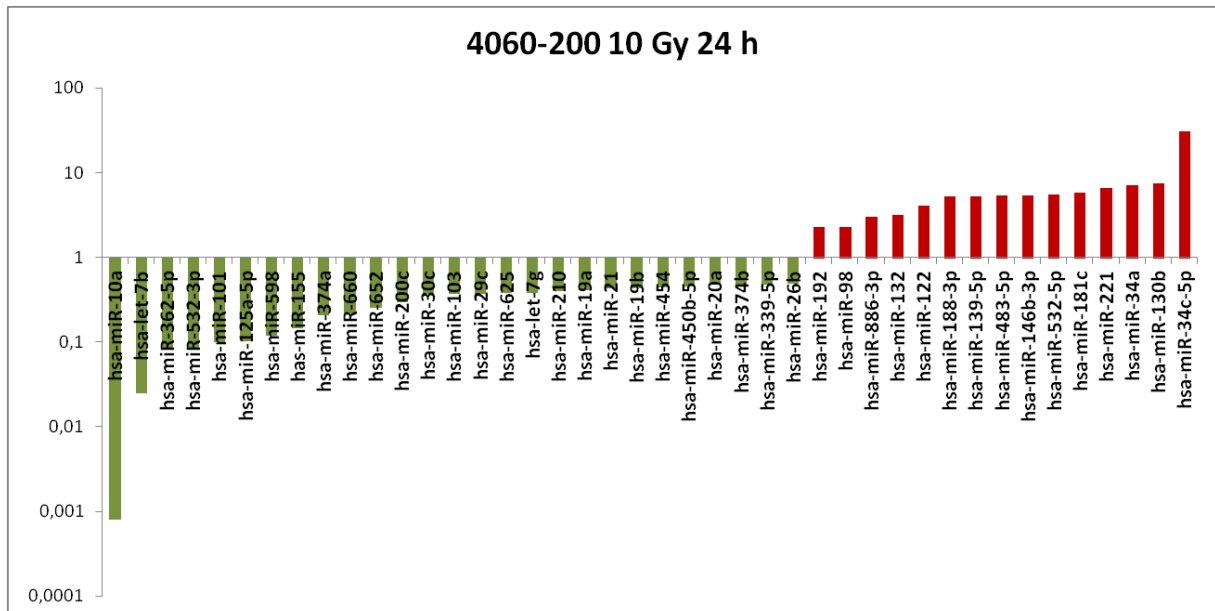


Abbildung 3.23: MiRNA Expressionsprofil der Strahlenantwort 24 h nach 10 Gy Bestrahlung in der sensitiven Linie 4060. Die Graphik zeigt alle differentiell exprimierten miRNAs 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy ($p < 0,05$, $0,5 >$ -fache Veränderung $> 2,0$). Hochregulierte miRNAs sind rot, herunterregulierte miRNAs grün dargestellt.

In einem letzten Ansatz wurden auch hier die zu beiden Zeitpunkten differentiell exprimierten miRNAs verglichen um die Anzahl der gemeinsamen miRNAs zu ermitteln. Die sensitive Linie 4060 zeigt mit 20 zu beiden Zeitpunkten deregulierten miRNAs die größte Überlappung in der miRNA-Expression verglichen mit den 3 anderen analysierten Linien (Abbildung 3.24). 10 der 20 miRNAs sind herunterreguliert (let-7b, let-7g, miR-200c, miR-362-5p, miR-374a, miR-374b, miR-532-3p, miR-625, miR-652, miR-660), 8 sind hochreguliert (miR-886-3p, miR-483-5p, miR-34c-5p, miR-192, miR-188-3p, miR-139-5p, miR-132, miR-130b) und die miRNAs miR-221 und miR-146b-3p zeigen ein gegensätzliches Expressionsmuster und sind beide nach 4 h vermindert, nach 24 h vermehrt exprimiert.

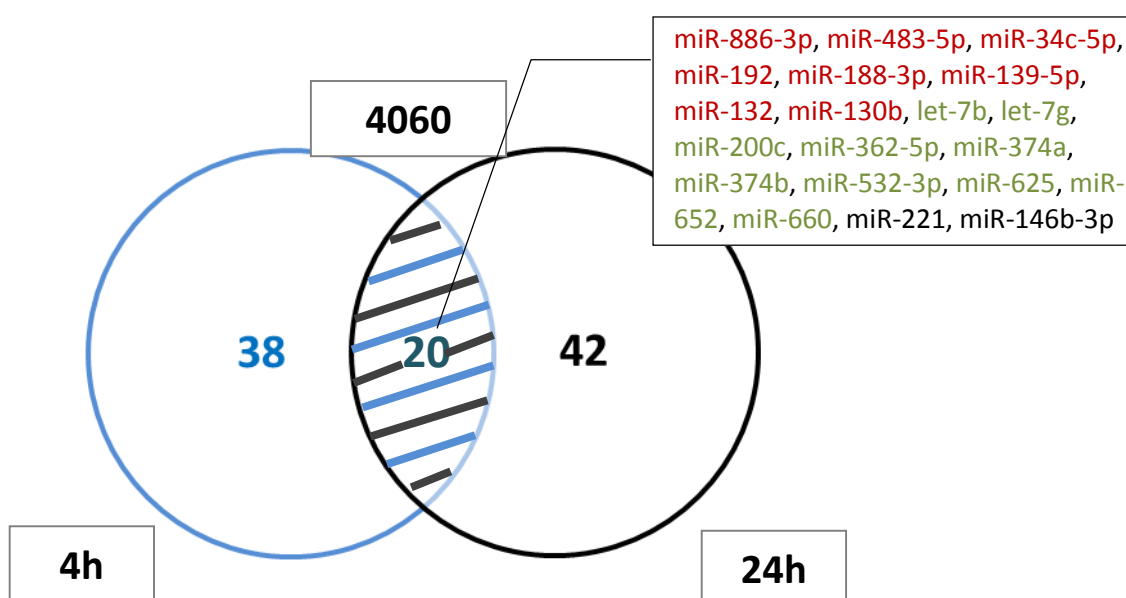


Abbildung 3.24: Venn Diagramm der differentiell exprimierten miRNAs 4 h und 24 h nach Bestrahlung in der strahlensensitiven Linie 20037. Das Diagramm zeigt die Anzahl der differentiell exprimierten miRNAs 4 h (blau) und 24 h (schwarz) nach Bestrahlung mit 10 Gy. Die Schnittmenge (schraffierter Bereich) umfasst alle 20 miRNAs, die zu beiden Zeitpunkten signifikant verändert waren. Die hochregulierten miRNAs sind rot, die herunterregulierten miRNAs grün markiert. Die beiden miRNAs, die zu beiden Zeitpunkten eine gegensätzliche Expression aufweisen, sind schwarz gekennzeichnet.

3.8.1 Vergleich der differentiell exprimierten miRNAs zwischen allen Zelllinien zu einem Zeitpunkt (4 h und 24 h) nach Bestrahlung mit 10 Gy

3.8.1.1 Vergleich der differentiell exprimierten miRNAs zwischen den Zelllinien GM03323(+) und GM03189(-) zu einem Zeitpunkt (4 h und 24 h) nach Bestrahlung mit 10 Gy

Um herauszufinden, wie viele miRNAs ubiquitär interindividuell nach Bestrahlung dereguliert sind, wurden die identifizierten miRNAs von einem Zeitpunkt und einer Dosis miteinander verglichen.

Ein Vergleich der deregulierten miRNAs zum Zeitpunkt 4 h zeigen nur 2 gemeinsame miRNAs zwischen den Kontrolllinien. Die miRNA let-7a und miR-425 sind 4 h nach Bestrahlung mit 10 Gy herunterreguliert (Abb.: 3.25).

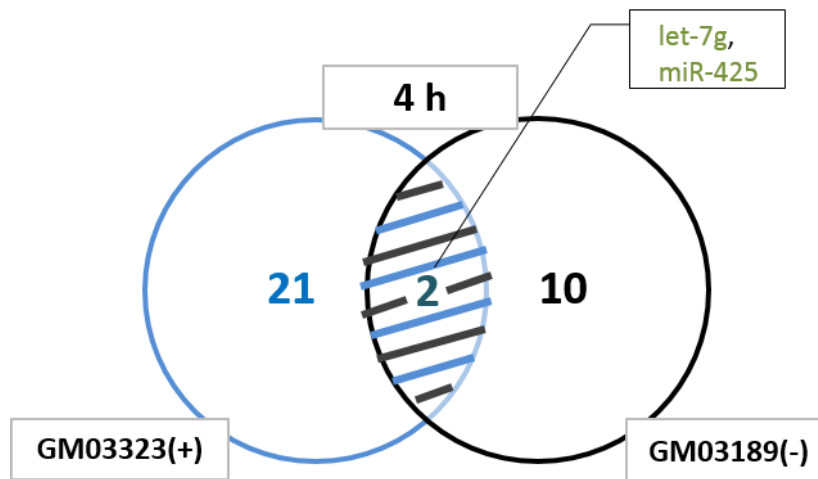


Abbildung 3.25: Venn Diagramm der differentiell exprimierten miRNAs 4 h nach Bestrahlung mit 10 Gy in den Kontrolllinien. Das Diagramm zeigt die Anzahl der differentiell exprimierten miRNAs 4 h nach Bestrahlung mit 10 Gy. Die Schnittmenge (schraffierter Bereich) zeigt die herunterregulierten miRNA1 let-7a und miR-425 (grün), die in beiden Linien verändert war.

Nach 24 h ist die miRNA let-7a in beiden Linien weiterhin herunterreguliert. Hinzu kommt miR-34a, die in der sensitiven Linie herunter-, in der resistenten Linie heraufreguliert ist (Abb.: 3.26).

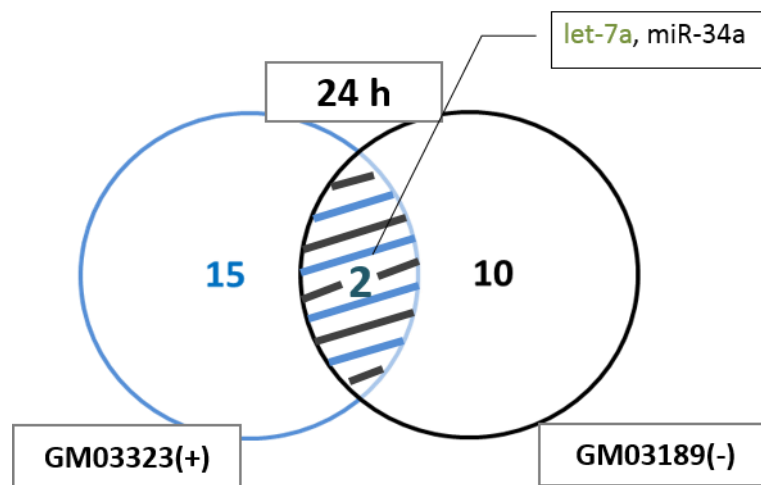


Abbildung 3.26: Venn Diagramm der differentiell exprimierten miRNAs 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy in den Kontrolllinien. Das Diagramm zeigt die Anzahl der differentiell exprimierten miRNAs 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy. Die Schnittmenge (schraffierter Bereich) zeigt die herunterregulierte miRNA let-7a (grün) und die miR-34a, die in beiden Linien gegensätzlich reguliert ist.

Der Vergleich der gemeinsam zu einem Zeitpunkt deregulierten miRNAs in beiden Kontrolllinien zeigt deutlich, dass die Strahlenantwort auf miRNA Ebene interindividuell sehr heterogen ist.

Dies bestätigt das Ergebnis der Proteom Profile, dass die interindividuelle Varianz in der Strahlenantwort sehr groß ist.

3.8.1.2 Vergleich der differentiell exprimierten miRNAs zwischen den Zelllinien 20037 und 4060 zu einem Zeitpunkt (4 h und 24 h) nach Bestrahlung mit 10 Gy

Zum Zeitpunkt 4 h nach Bestrahlung mit 10 Gy sind 11 miRNAs in beiden LUCY-Linien dereguliert, wobei 2 miRNAs hoch- und 6 miRNAs herunterreguliert waren. Die miRNAs miR-127-5p und miR-34c-5p sind in der Linie 4060 hoch, in der Linie 20037 herunterreguliert. Die Regulation der miR-628-5p ist in den beiden Linien ebenfalls gegensätzlich. In der Linie 20037 wird miR628-5p hochreguliert, in der Linie 4060 herunterreguliert (Abb.: 3.27).

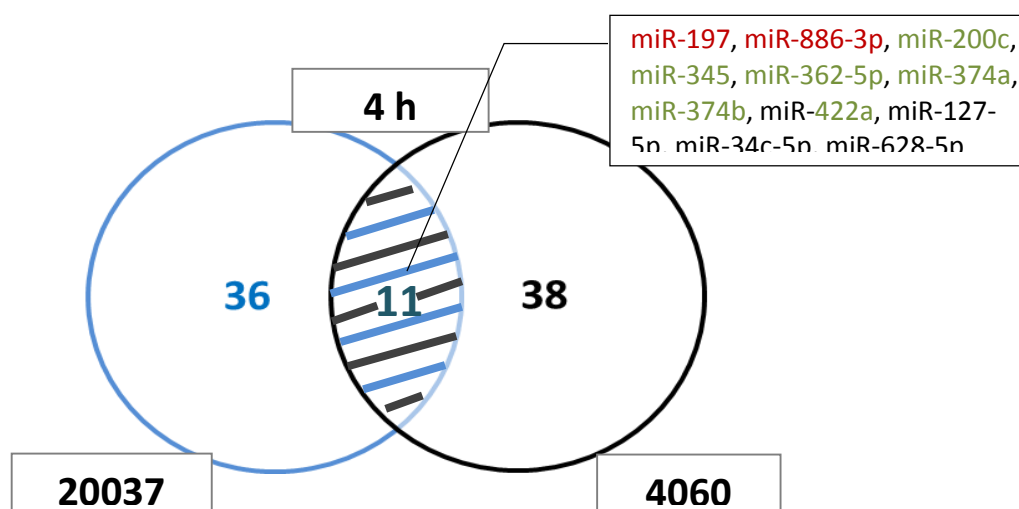


Abbildung 3.27: Venn Diagramm der differentiell exprimierten miRNAs 4 h nach Bestrahlung in den LUCY-Linien. Das Diagramm zeigt die Anzahl der differentiell exprimierten miRNAs nach Bestrahlung mit 10 Gy. Die Schnittmenge (schraffierter Bereich) umfasst alle 11 miRNAs, die in beiden Linien signifikant verändert waren. Die hochregulierten miRNAs sind rot, die herunterregulierten miRNAs grün markiert. Die 3 miRNAs, die zu beiden Zeitpunkten eine gegensätzliche Expression aufweisen, sind schwarz gekennzeichnet.

In Abbildung 3.28 sind die 7 miRNAs gezeigt, die in beiden LUCY-Linien gemeinsam nach Bestrahlung dereguliert sind. Nur die miR-34c-5p ist wie nach 4 h, noch in beiden Linien gegensätzlich reguliert. Die miRNAs miR-139-5p und miR-192 werden hoch, die miRNAs miR-155, miR-19a und miR660 werden herunterreguliert. MiR-558 ist in den Linien gegensätzlich dereguliert, wobei in der Linie 4060 eine verminderte Expression, in der Linie 20037 eine erhöhte Expression vorliegt.

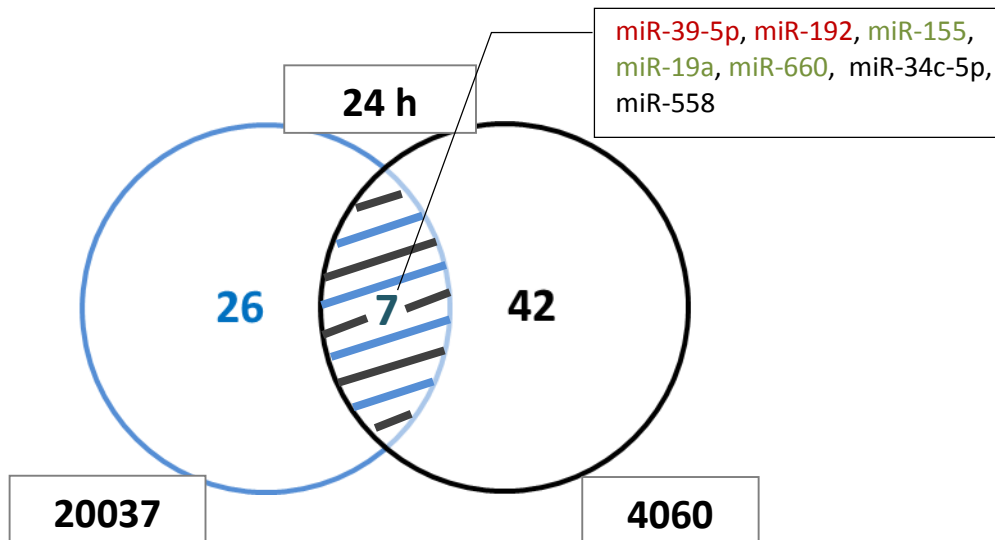


Abbildung 3.28: Venn Diagramm der differentiell exprimierten miRNAs 24 h nach Bestrahlung in den LUCY-Linien. Das Diagramm zeigt die Anzahl der differentiell exprimierten miRNAs nach Bestrahlung mit 10 Gy. Die Schnittmenge (schraffierter Bereich) umfasst alle 7 miRNAs, die in beiden Linien signifikant verändert waren. Die hochregulierten miRNAs sind rot, die herunterregulierten miRNAs grün markiert. Die beiden miRNAs, die zu beiden Zeitpunkten eine gegensätzliche Expression aufweisen, sind schwarz gekennzeichnet.

Der Vergleich der gemeinsamen miRNAs in den LUCY-Linien bestätigt ebenfalls die interindividuelle Heterogenität in der Strahlenantwort.

3.9 Bioinformatische Netzwerkanalyse der deregulierten Proteine und miRNAs nach Bestrahlung in den Kontrolllinien Linien GM03323(+) und GM03189(-)

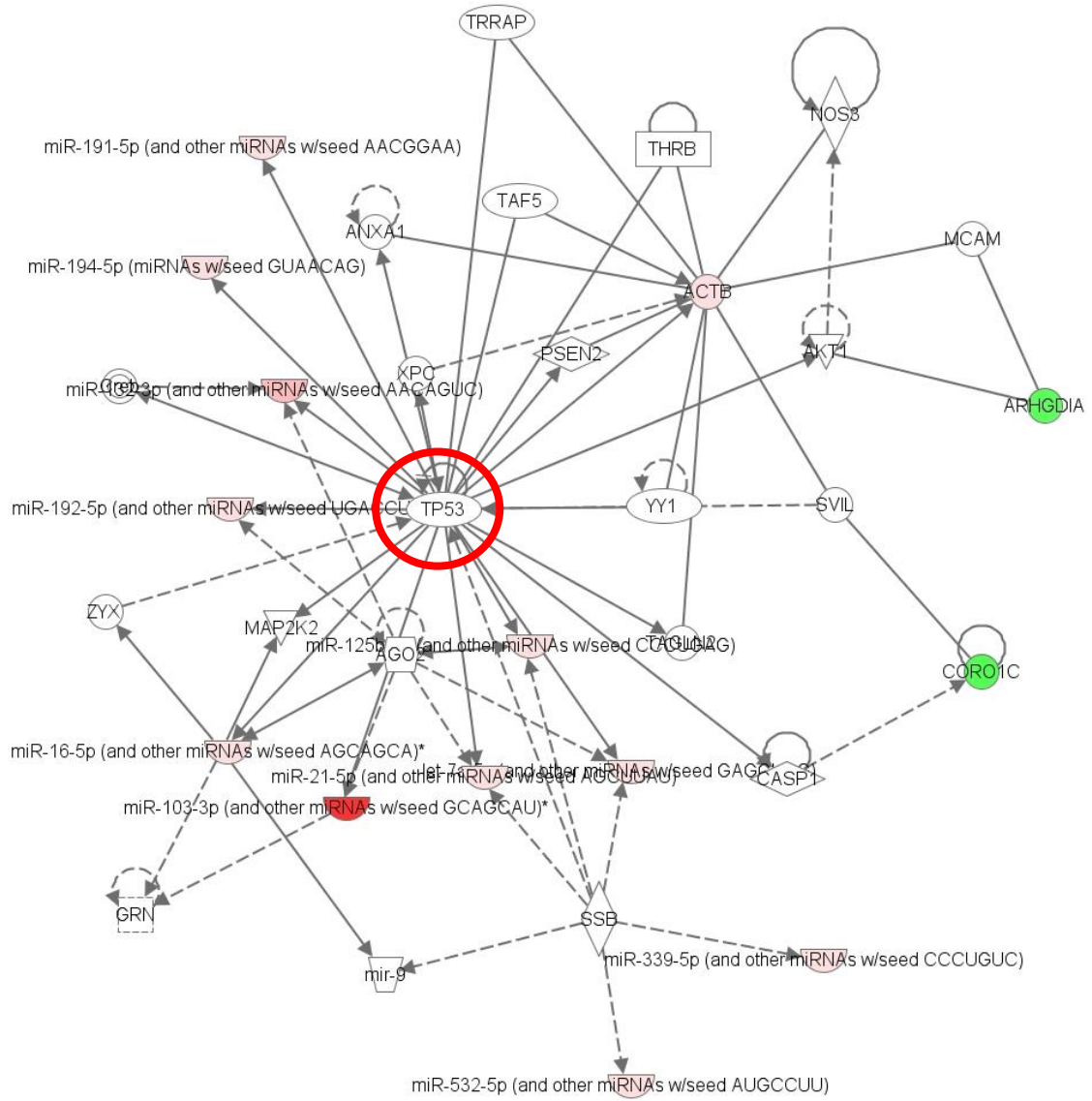
Für die weitere Charakterisierung der Proteine und miRNAs wurden die Daten der Protein- und miRNA-Analyse der Linien GM03323(+) und GM03189(-) 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy gekoppelt und mit Hilfe der Software Ingenuity auf Interaktionen untersucht. Die biologische Verbindung zwischen einzelnen Faktoren wird in einer zweidimensionalen Graphik visualisiert.

Ziel dieser Analyse ist es, die große Anzahl an veränderten Proteinen, sowie die Daten der miRNA-Expressionsänderung die aus den vorangegangenen Experimenten generiert wurden, zu kombinieren und biologischen Netzwerken zuzuordnen. Die Netzwerke werden mit einer Score bewertet. Wird eine Punktzahl > 20 erreicht, wird ein Netzwerk als hochsignifikant angesehen.

Die Netzwerkanalyse der Linie GM03323(+) 4 h nach Bestrahlung mit 10 Gy ergab ein hochsignifikantes Netzwerk (Score 31). Das Netzwerk beinhaltet die Funktionen *Cancer*, *Hematological Disease*, *Immunological Disease*. 13 Moleküle aus den vorangegangenen Experimenten wurden in die Analyse aufgenommen (Abb.: 3.29 A).

24 h nach Bestrahlung war ein Netzwerk mit einer Score 21 signifikant, welches in die Kategorie *Cell Cycle*, *Cancer*, *Gastrointestinal Disease* fällt. 11 Moleküle die in dieser Arbeit als dereguliert gefunden wurden, sind im Netzwerk vorhanden (Abb.: 3.29 B).

A



B

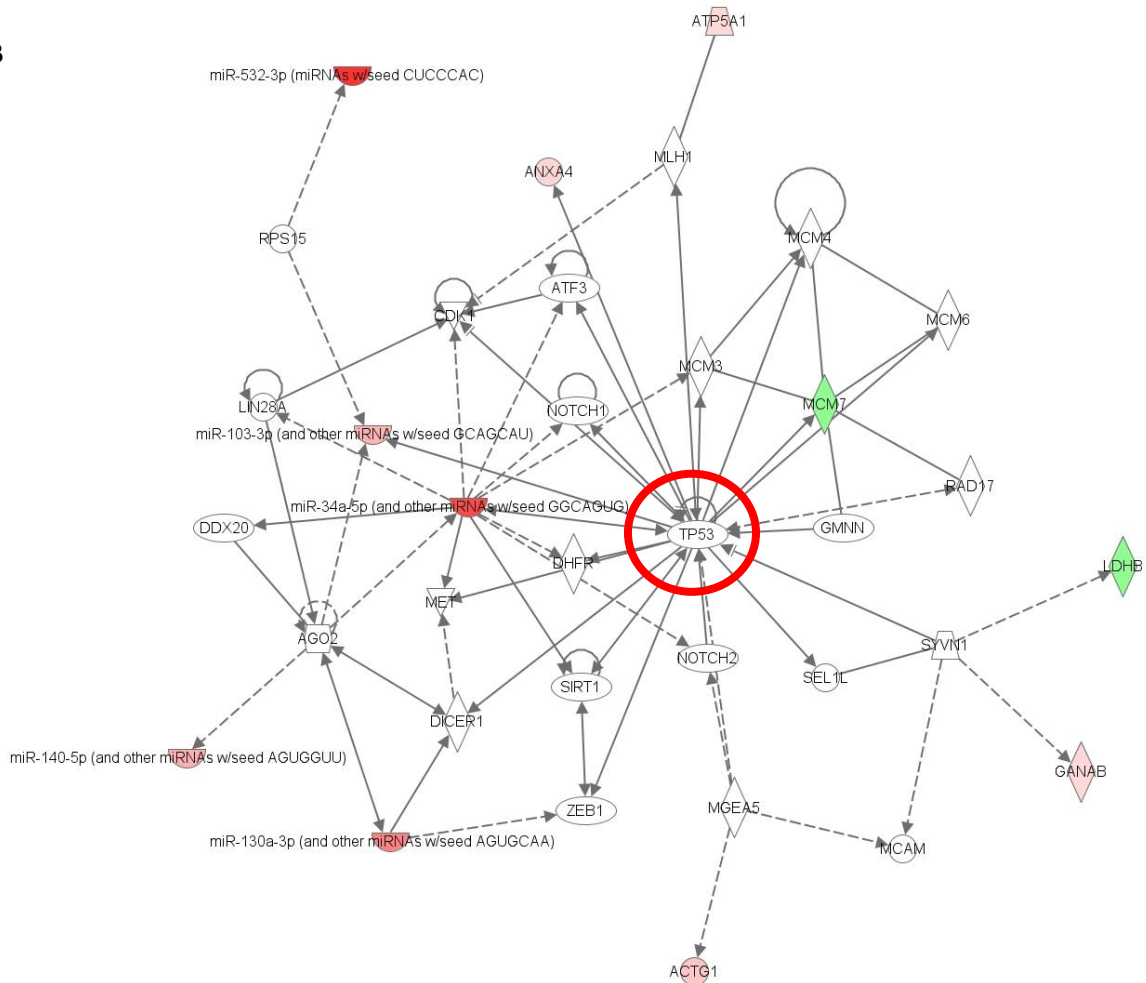


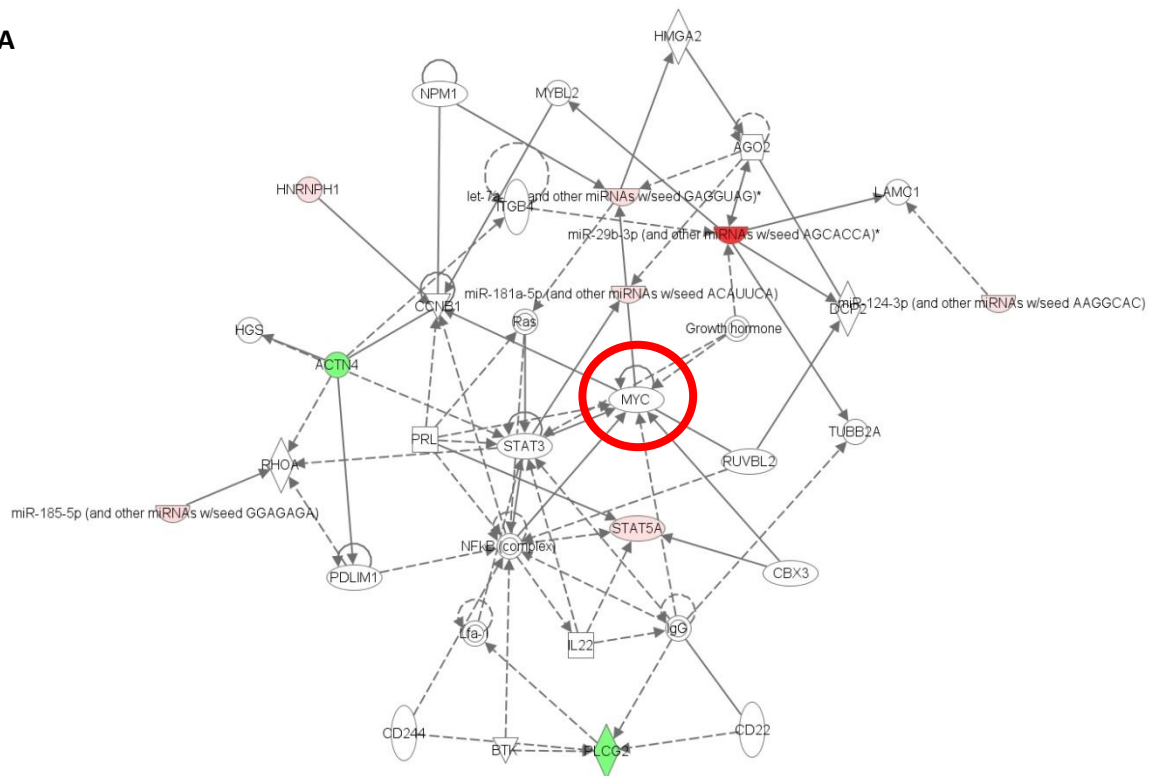
Abbildung 3.29 A/B: Interaktions-Netzwerk der im 2D-DIGE und TaqMan Low Density Array-veränderten Proteine und miRNAs in der Linie GM03323(+). Es ist die Ingenuity-Netzwerk-Analyse nach Bestrahlung mit 10 Gy der Linie GM03323(+) dargestellt. Die Ingenuity-Netzwerkanalyse zeigt die direkte (durchgezogener Pfeil) und indirekte (gestrichelter Pfeil) Interaktion mit anderen Molekülen (weiße Symbole). Rote Symbole zeigen hochregulierte miRNAs oder Proteine, grüne Symbole herunterregulierte miRNAs oder Proteine an. **A** zeigt mit einer Score 31 das betroffene miRNA-Protein-Netzwerk 4 h nach Bestrahlung. Die Netzwerk-Funktionen fallen unter die IPA generierte Kategorie *Cancer, Hematological Disease, Immunological Disease*. **B** zeigt das Netzwerk *Cell Cycle, Cancer, Gastrointestinal Disease*“ (Score 21) für die Analyse der miRNAs und Proteine 24 h nach Bestrahlung.

Wie nach der Netzwerk-Analyse der deregulierten Proteine, ist auch hier, zu beiden Zeitpunkten, das zentrale Protein TP53. 4 h nach Bestrahlung war die Netzwerk-Analyse der Proteine allein mit einer Score 13 nicht signifikant. Durch die Kombination der Protein-Daten mit dem Ergebnis der miRNA-Analyse ist das Netzwerk signifikant.

Die Netzwerkanalyse der Linie GM03189(-) 4 h nach Bestrahlung mit 10 Gy ergab ein signifikantes Netzwerk mit einer Score 20. Das Netzwerk beinhaltet die Funktionen *Cellular Development*, *Cellular Growth and Proliferation*, *Hematological System Development and Function*. 9 Moleküle aus den vorangegangenen Experimenten wurden in die Analyse aufgenommen. Abbildung 3.30 A zeigt das signifikante Netzwerk.

24 h nach Bestrahlung war ein Netzwerk mit einer Score 30 hochsignifikant, welches in die Kategorie *Cancer*, *Respiratory Disease*, *Cell Cycle* fällt. 14 Moleküle, die in dieser Zelllinie als dereguliert gefunden wurden, sind im Netzwerk vorhanden (Abb.: 3.30 B).

A



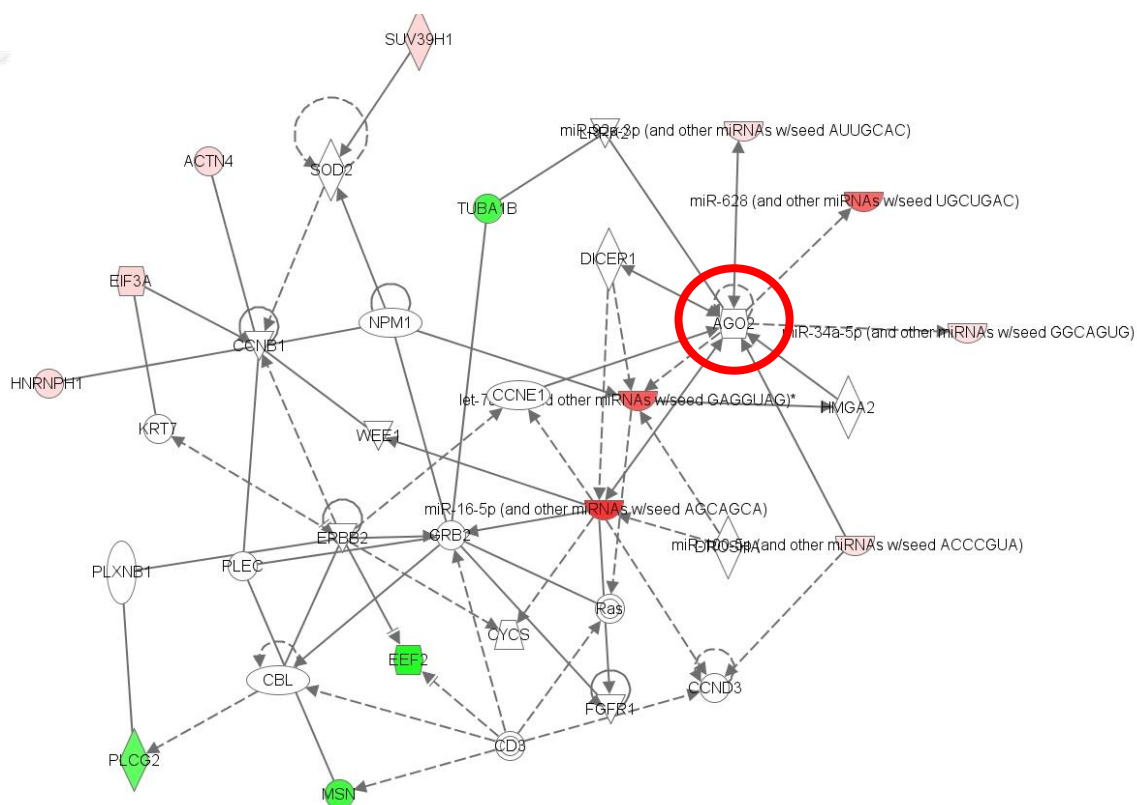


Abbildung 3.30 A/B: Interaktions-Netzwerke der im 2D-DIGE und TaqMan *Low Density Array*-veränderten Proteine und miRNAs in der sensitiven Kontrolllinie GM03189(-). Es ist die Ingenuity Netzwerk-Analyse nach Bestrahlung mit 10 Gy der Linie GM03189(-) dargestellt. Die Ingenuity-Netzwerkanalyse zeigt die direkte (durchgezogener Pfeil) und indirekte (gestrichelter Pfeil) Interaktion mit anderen Molekülen (weiße Symbole). Rote Symbole zeigen hochregulierte miRNAs oder Proteine, grüne Symbole herunterregulierte miRNAs oder Proteine an. **A** zeigt mit einer Score 20 das betroffene miRNA-Protein-Netzwerk 4 h nach Bestrahlung. Die Netzwerk-Funktionen fallen unter die IPA generierte Kategorie *Cancer, Hematological Disease, Immunological Disease*. **B** zeigt das Netzwerk *Cell Cycle, Cancer, Gastrointestinal Disease* (Score 30) für die Analyse der miRNAs und Proteine 24 h nach Bestrahlung.

Nach der kombinierten Netzwerk-Analyse ist MYC nach 4 h das zentrale Protein, während es nach Analyse der Proteine allein TNF war. 24 h nach Bestrahlung ist Argonaut2 (AGO2) das zentrale Protein.

3.10 Korrelation der WST-1 Viabilitätsdaten 24 h und 48 h nach Bestrahlung mit 10 Gy mit 4 ausgewählten SNPs

Die Zellen der LUCY-Studie wurden bezüglich einiger SNPs genotypisiert. Albert Rosenberger (EPI - Institut für Epidemiologie, Helmholtz Zentrum München) korrelierte die Daten zur Viabilität der 92 LUCY-Linien, die 24 und 48 h nach Bestrahlung mit 10 Gy mit dem WST-1 Test generiert wurden (siehe Kapitel 3.2.1).

Für die Korrelationsberechnungen wurden 4 funktionelle SNPs ausgewählt. 2 SNPs befinden sich im ATM-Gen (rs228589, hier genannt ATM_1 und rs1800889, hier genannt ATM_3). Die 2 weiteren SNPs befinden sich im NBS-Gen (rs709816, hier als NBN_1 bezeichnet und rs1805796 NBN_5). Die Berechnung der Daten erfolgte für diese SNPs, da es sich um Mutationen in den Genen handelt, die stark mit Strahlenempfindlichkeit assoziiert sind. In Abbildung 3.31 sind die Korrelationen aller WST-1 Daten zu den gewählten SNPs gezeigt. Die zugehörigen Daten für die hier beschriebenen Zelllinien sind der Tabelle 6 im Anhang zu entnehmen.

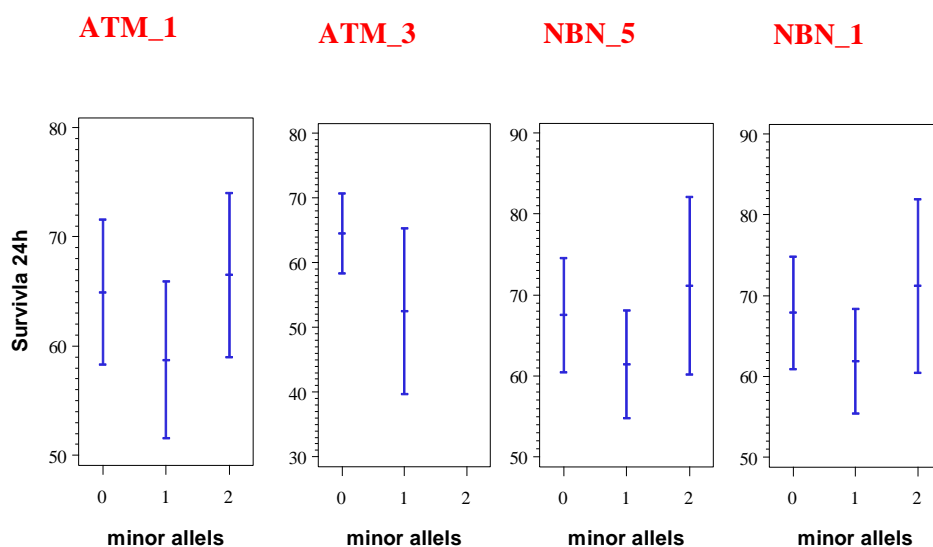


Abbildung 3.31: Korrelation ausgewählter SNPs mit den Daten des WST-1 Viabilitätstest der 92 LUCY-Zelllinien

Tabelle 3.21 zeigt die 4 gewählten SNPs der analysierten, strahlenempfindlichen Linien. Blau kennzeichnet die resistente, orange die Zelllinien mit einer durchschnittlichen Empfindlichkeit. Rot sind die strahlensensitiven LUCY-Linien dargestellt.

Tabelle 3.21: Genotypisierung von 4 funktionellen SNPs in den strahlenempfindlichen LUCY-Linien.

ID	24 h 10 Gy	48 h 10 Gy	Gruppe	Alter	Geschl.	ATM_1 rs228589	ATM_3 rs1800889	NBS_1 rs709816	NBS_5 rs1805796
20037-200	84,92	80,14	Indexpatient	47	2	0	0	0	0
4008-200	46,41	38,26	Indexpatient	43	2	2	0	1	1
36011-200	45,27	43,63	Indexpatient	42	1	0	0	0	0
4028-200	52,91	40,58	Indexpatient	49	2	2	0	1	1
4039-200	44,36	38,98	Indexpatient	41	2	1	1	1	1
4060-200	36,97	27,65	Indexpatient	37	2	1	0	0	0
20038-200	50,37	34,83	Indexpatient	40	1	0	0	0	0

Wie bei den anderen Analysen zeigt sich auch bei der Korrelation der SNPs zum strahlenempfindlichen Phänotyp, dass es keine signifikanten interindividuellen Gemeinsamkeiten gibt.

4 Diskussion

4.1 Eignung von EBV-immortalisierten Zelllinien zur Analyse der Strahlenempfindlichkeit

Durch transformierende Viren, wie z.B. EBV, können einige Zellen das Phänomen der Seneszenz überwinden. Um B-Lymphozyten dauerhaft kultivieren zu können, werden diese mit Hilfe des Epstein-Barr-Virus transformiert und werden immortalisiert als lymphoblastoide Zelllinien bezeichnet (Miller und Lipman 1973, Rabin et al. 1978, Rooney et al. 1984). Die virale DNA kann als Plasmid mit 5-800 Kopien/Zelle (Yates et al. 1984), oder bei einigen Linien integriert in die Wirts-DNA vorliegen (Henderson A. et al. 1983).

EBV bindet über spezifische Rezeptoren der Zelloberfläche selektiv an B-Lymphozyten, wobei nur eine Subpopulation der Zellen betroffen ist und nicht die Gesamtheit der B-Zell-Klone (Schneider und zur Hausen 1975). Eine weitere Selektion findet statt, da hierbei nur ein kleiner Teil der Zellen immortalisiert wird. Nach erfolgreicher Immortalisierung wurden die Zelllinien kloniert, um eine homogene Zelllinie zu generieren. Experimente mit unterschiedlichen Klonen eines Individuums geben Hinweise, dass die unterschiedlichen Klone sehr heterogen sind.

Dies konnte in dieser Arbeit während des Zellüberlebenstest beobachtet werden. Die LUCY-Linie 4040 wurde zweimal immortalisiert. Zum einen am Helmholtz Zentrum München und zum anderen am BfS, Oberschleißheim. Die beiden unterschiedlichen Klone zeigten nach Bestrahlung eine unterschiedliche Vitalität. Eine der Linien war nach den in dieser Arbeit angewendeten Kriterien sensitiv, während der andere Klon normal reagierte. Die Unterschiede dieser beiden Klone konnte jedoch nicht weiter untersucht werden, da der normal reagierende Klon sich nicht dauerhaft kultivieren ließ.

Es konnte beobachtet werden, dass in EBV-transformierten B-Zellen die Telomerlänge zunächst abnimmt (Counter et al. 1992). Nur durch die Induktion einer hohen Telomerase-Aktivität (> 50 fache Erhöhung der Aktivität) und die resultierende Telomerase-Stabilisierung ist die Voraussetzung für die Immortalisierung EBV-transformierter B-Zellen gegeben (Kataoka et al. 1997). Dies kann das Phänomen erklären, dass sich nur 92 LUCY-Zelllinien der 120 untersuchenden Zelllinien stabil kultivieren lassen. Die 28 übrigen Linien zeigten keine bzw. eine

anfangs verminderte Proliferation, die nach 5-50 Generationszeiten stoppt. Dies ist wahrscheinlich durch die fehlende Telomerase-Aktivität zu erklären. Es ist ebenfalls in der Literatur beschrieben, dass ein Teil der LCLs die Proliferation vor Erreichen von 160 Generationszeiten einstellt (Okubo et al. 2001).

Mit der erhöhten Telomerase-Aktivität nach Immortalisierung geht eine Veränderung des Karyotyps einher (Kataoka et al. 1997, Okubo et al. 2001). Des Weiteren wurde publiziert, dass lymphoblastoide Zelllinien durch die Immortalisierung mit EBV genomisch instabil sind. Dies wird durch Studien belegt, in denen gezeigt wurde, dass in diesem Zellsystem eine spontane Bildung von Mikronuklei gemessen werden kann (Gualandi et al. 2001). Um die Karyotypen der verwendeten Zelllinien genau zu bestimmen und um auszuschließen, dass die unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit in der unterschiedlichen genetischen Stabilität aufgrund der Immortalisierung determiniert ist, wurde von Susanne Schmeißer (Bundesamt für Strahlenschutz) eine mFISH-Analyse zur Bestimmung der Karyotypen durchgeführt. Die hier verwendeten Zelllinien 4008, 4039, 4060, 20038 und 36011 zeigen mit 44 Autosomen und 2 Gonosomen einen stabilen, normalen Karyotyp mit unverändertem Chromosomensatz. Die Linie 4028 besteht fast ausschließlich aus einem stabilen Klon, bei dem das zweite X-Chromosom fehlt (45,X,-X). Die Linie 20037 zeigt 4 stabile Klone (46,XX,der(10)add(18) [27]; 46,XX,dic(6;7) [7]; 46,XX,der(7)add(15) [5]; 46,XX,dic(7;8) [4]), wobei jedoch die Mehrzahl der analysierten Zellen einen normalen weiblichen Karyotyp (46,XX) aufweist. Die Zelllinien besitzen alle eine Generationszahl < 80. Die Entstehung von abnormalen Klonen erfolgt jedoch erst nach längerer Kultivierung (Generationszahl > 100) (Okubo et al. 2001). Die frühzeitige Entstehung der stabilen Klone der Linie 20037 nach der kurzen Kultivierungszeit und vor allem der Fakt, dass zwei der Klone dizentrische Chromosomen aufweisen, ist wahrscheinlich darin begründet, dass sich die betroffene LUCY-Patientin vor der Blutentnahme einer Chemotherapie unterzogen hat. Diese Auskunft wurde erst nach den Proteomics Experimenten, die mit dieser Linie durchgeführt wurden, erteilt. Die als Kontrollen verwendeten LCLs GM031789(-) und GM03323(+) wurden käuflich erworben und es gab keine Informationen über die Generationszahl. Da diese Linien jedoch seit den 1980er Jahren etabliert sind, ist anzunehmen, dass die Zahl weit über 200 liegt. Die zwei erworbenen Kontrolllinien zeigen in der Mehrheit der Zellen einen normalen Karyotyp und besitzen einen (GM03323(+): 45,XY,-19 [3]), bzw. 2 stabile Klone (GM03189(-): 46,XY,der(22)add(20) [5]; 46,XY,der(22)add(3) [2]). Die Linie HuKo wurde am BfS immortalisiert und wurde nach 125 Generationen karyotypisiert. Sie besitzt 2 stabile Klone 46,XY,der(19)add(13) [25] und 47,XY,+8 [12] und nur eine kleine Subpopulation mit normalem Karyotyp (46,XY). Dem

Probanden wurde im Anschluss erneut Blut entnommen und der Karyotyp in primären Lymphozyten bestimmt. Die gefundenen aberranten Klone sind im primären Material nicht nachweisbar. Somit ist die Veränderung des Karyotyps mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Immortalisierung zurückzuführen. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die gefundenen chromosomalen Veränderungen den Kriterien entsprechen, die in der Literatur für LCLs beschrieben sind. Die Veränderungen innerhalb einer Linie sind klonal, sie bestehen aus Translokationen (und Tetraploidie, die hier jedoch nicht beobachtet werden konnte) und sind für jede Linie spezifisch, d.h. es gibt keine bestimmten Aberrationen, die für diese Zelllinien ubiquitär sind (Okubo et al., 2001).

Das in dieser Arbeit verwendete zelluläre System immortalisierter, lymphoblastoider Zelllinien wurde dennoch für die Analyse strahleninduzierter Effekte im Normalgewebe verwendet, da der strahlenempfindliche Phänotyp in allen lymphoblastoiden Zelllinien mit mehreren Methoden verifiziert werden konnte (Maroschik et al. 2013). Darüber hinaus war es möglich, den Phänotyp ohne Vorkenntnisse über die Empfindlichkeit in einem zweiten Labor zu verifizieren (Guertler et al. 2009). Dies war eine gute Voraussetzung für die weitere Charakterisierung der Strahlenempfindlichkeit in lymphoblastoiden Zelllinien.

LCLs werden häufig für Studien der Strahlenantwort gewählt, wenn der Strahleneffekt in Normalgewebe beobachtet werden soll (Nuta et al. 2014, Rashi-Elkeles et al. 2011)

4.2 Zellüberleben nach Bestrahlung

Die Fähigkeit des Zellüberlebens kann die Sensitivität von Zellen gegenüber ionisierender Strahlung anhand ihrer eingeschränkten, bzw. uneingeschränkten Fähigkeit zur Zellteilung beschreiben. Als klassische Methode der Strahlenbiologie wird das Zellüberleben mit Hilfe des klonogenen Überlebens der Zellen (colony survival assay) ermittelt (Franken et al. 2006). Der klonogene Überlebenstest wurde in dieser Arbeit nicht verwendet, da er für adhärent wachsende Zellen besser geeignet ist und eine Einbettung der Suspensionszellen in eine Matrix zur Erfassung der überlebenden Kolonien für die Anzahl der getesteten Linien zu langwierig gewesen wäre. Deshalb wurde der WST-1 Test, sowie der Trypanblautest, für die Messung der Viabilität und

Vitalität nach Bestrahlung, zur Untersuchung der Strahlenempfindlichkeit in lymphoblastoiden Zelllinien genutzt.

In dieser Arbeit wurde die Strahlensensitivität von 92 Zelllinien der LUCY-Studie bezüglich des Zellüberlebens nach 24 h und 48 h nach Bestrahlung mit 10 Gy (^{137}Cs -Quelle) gemessen, um unterschiedlich empfindliche Zellen zu detektieren. Diese hohe Dosis erwies sich als am besten geeignet, um die Unterschiede in der Radiosensitivität deutlich zu detektieren. Die trotz der applizierten hohen Dosis große überlebende Zellfraktion ist wohl darin zu begründen, dass die Zytotoxizität in EBV-immortalisierten Zelllinien abnimmt (Okada et al. 1998) und EBV-spezifische antiapoptotische Proteine exprimiert werden (Cohen 2000, Henderson S. et al. 1993, Lee et al. 2004). Die Untersuchung der Vitalität und Viabilität nach 24 h und 48 h erwies sich als sinnvoll, da die Unterschiede im Zellüberleben zwischen den analysierten Zelllinien signifikant waren. Diese frühen Zeitpunkte wurden bereits für Apoptose Messungen in LCLs verwendet, bei denen zum Zeitpunkt 48 h post-Bestrahlung die höchste Zelltodrate messbar war (Greve et al. 2009). Da lymphoblastoide Zellen als Suspensionskultur wachsen, wurde das Zellüberleben primär über das Trypanblau-Ausschlussprinzip bestimmt. Darüber hinaus stellte sich der WST-1 Test als verlässliche Methode heraus, um die Zellproliferation nach Bestrahlung zu detektieren. Um Radiosensitivität eindeutig zu bestimmen ist es wichtig, dass die Ergebnisse reproduzierbar und valide sind. Überlebensdaten nach Bestrahlung konnten von einem zweiten Labor mit dem Trypanblautest bestätigt werden (Guertler et al. 2011). Es ist bekannt, dass ein genetischer Defekt wie Ataxia telangiectasia einen Risikofaktor darstellt, der die Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung von Patienten, die sich einer Strahlentherapie unterziehen, erhöht (Shi et al. 2001). Es ist ebenfalls in der Literatur beschrieben, dass 5-10 % der Patienten, die sich einer Radiotherapie unterziehen bei der üblicherweise angewandten Dosis akute Reaktionen des Normalgewebes zeigen, die nicht auf bekannte Risikofaktoren zurückzuführen sind. In dieser Arbeit wurden 5 LUCY-Linien nach Bestrahlung im Trypanblautest und WST-1 Test als strahlensensitiv kategorisiert. Dies entspricht einem prozentualen Anteil von $\sim 5,4$ % des hier analysierten LUCY-Kollektivs. Dies lässt jedoch nicht den Rückschluss auf die 5-10 % der strahlensensitiven Therapiepatienten zu, da die Therapiedosis nur so hoch gewählt wird, dass ca. 5-10 % Nebeneffekte zeigen. Würde die angewandte Dosis niedriger gewählt, wäre der prozentuale Anteil strahlenempfindlicher Patienten nach der Radiotherapie geringer. Generell gibt es viele verschiedene Möglichkeiten die intrinsische Strahlensensitivität einzelner Zelltypen zu erklären. Die unterschiedliche Strahlensensitivität der Zellen kann beispielsweise durch die unterschiedliche Anzahl der initialen

DNA-Läsionen, die bei gleicher Dosis induziert werden, erklärt werden. Nach heutigem Kenntnisstand könnte die unterschiedliche Chromatinstruktur dafür verantwortlich sein (Storch et al. 2010), sowie die unterschiedliche Effizienz der Reparaturprozesse, oder sogar durch das Fehlen eines Reparaturmechanismus verursacht werden (Maroschik et al. 2013; Lees-Miller et al. 1995). Und schließlich kann die unterschiedliche Strahlensensitivität durch Defekte und Modulation in der Zellzyklusregulation, der Apoptoserate, oder Sensenz verursacht werden (Pawlik und Keyomarsi 2004, Sudo et al. 2007).

4.3 Differentielle Proteom-und MALDI-TOF/MS-Analyse

Um die Komplexität des Proteoms zu einem gegebenen Zeitpunkt zu erfassen, ist es nötig, tausende Proteine zu detektieren und zu analysieren. Ein erster Schritt, um komplexe Proteinextrakte in einzelne Proteine aufzutrennen, wurde mit der Etablierung der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2 DE) gemacht (Klose 1975). Bei dieser Methode wird die Trennung in der ersten Dimension, die sog. isoelektrische Fokussierung [Trennung der Proteine über den isoelektrischen Punkt (pI)], mit Hilfe von Trägerampholyten durchgeführt, die im elektrischen Feld einen pH-Gradienten aufbauen. Die Proteine wandern im elektrischen Feld bis zu ihrem jeweiligen pI, an dem die Nettoladung Null beträgt. Dort verbleiben sie bis zu ihrer Auftrennung in der zweiten Dimension mittels SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-polyacrylamidgel-elektrophorese), bei der die Proteine nach Molekulargewicht (MW) getrennt werden (Laemmli, 1970). Hierbei erfolgt eine Maskierung der Proteineigenladung durch die negative Ladung des SDS. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes erfolgt die Migration der Proteine durch die Gelmatrix in Richtung der Kathode. Aufgrund der Porenstruktur agiert das Gel als Sieb, welches kleine Proteine schneller passieren können, als Proteine mit großem Molekulargewicht.

Die Proteinabundanz bestimmter Proteine in einer einzelnen Zelle ist sehr heterogen und reicht von mehreren Millionen Kopien pro Zelle bis zu ein paar wenigen Kopien der niedrig abundanten Proteine. Dies stellt eine enorme Herausforderung für die Farbstoffe dar (Corthals et al. 2000).

Die Färbemethoden sind ein limitierender Faktor für die Visualisierung aller Proteine. Damit die Mehrheit der Proteine erfasst werden kann, müssen die Farbstoffe hoch sensitiv sein, um auch die Detektion niedrig abundanter Proteine zu gewährleisten. Für eine genaue Quantifizierung ist es erforderlich, dass sie einen großen linear dynamischen Bereich abdecken. Darüber hinaus muss der Farbstoff mit den sich anschließenden Identifizierungsmethoden, wie MALDI-TOF, kompatibel sein. Mit dem Verfahren der in dieser Arbeit verwendeten Minimal-Markierung (GE) ist es mit einer Nachweisgrenze von 100 – 200 pg (Tonge et al. 2001) möglich, bei einer eingesetzten Menge von 50 µg Protein 3000–5000 Kopien eines 50 kDa Proteins/Zelle nachzuweisen (Gygi et al. 2000). Proteine mit kleinerer Kopienzahl, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, können hier nur schwer erfasst werden.

Ein weiterer kritischer Faktor von 2 DE ist die Auswertung über Softwarebasierte Bildanalyse. Bei der konventionellen 2D-Gelelektrophorese wird jeweils eine zu analysierende Probe auf einem Gel separiert, Spots werden nach der Elektrophorese durch unterschiedliche Färbemethoden sichtbar gemacht und anschließend die Spotintensitäten der einzelnen Gele miteinander verglichen. Da die Polymerisation von Gel zu Gel variiert, ist die zweidimensionale Separierung der Proteine von Gel zu Gel unterschiedlich und die Auswertung über das Bildanalyseverfahren sehr aufwendig, was viele falsch positive Ergebnisse zur Folge haben kann.

Aus diesem Grund entwickelten Ünlü *et al.* die DIGETM-Methode (*difference in-gel electrophoresis*) (Unlu et al. 1997). Zwei Proben werden *in vitro* mit zwei verschiedenen fluoreszierenden Cyaninfarbstoffen markiert, die sich in ihrer Emissionswellenlänge unterscheiden. Diese Proben werden vereint und im Anschluss zweidimensional aufgetrennt. Durch die Co-Migration im Gel sind gleiche Spots aus zwei unterschiedlichen Proben an denselben Koordinaten zu finden, was die Problematik der Gel-zu-Gel-Varianz, wie sie bei unterschiedlichen Gelläufen auftritt, ausschließt. Ein dritter Cyaninfarbstoff wird verwendet, um einen internen Standard zu generieren, der alle zu vergleichenden Proben zu gleichen Teilen beinhaltet und daher jedes Protein jeder zu vergleichenden Probe enthält. Der interne Standard ist auf allen Gelen einer Analyseserie vorhanden und wird zur Normalisierung der Spots verwendet. Durch den internen Standard wird die Variation zwischen den unterschiedlichen Gelläufen minimiert und der Abgleich der Proteinmuster für eine genaue Zuordnung und Überlagerung der Spots wird erleichtert. Durch diese Normalisierung ist die Quantifizierung der Proteinabundanz unterschiedlicher Gele genauer und es werden weniger falsch positive Treffer erzeugt (Alban et al. 2003). Nach Angaben des Herstellers (GE Healthcare) ist es möglich, aufgrund des internen Standards und der Verwendung der zwei weiteren Cyaninfarbstoffe Expressionsunterschiede < 10 % signifikant zu analysieren.

Dies ermöglicht, die niedrigen Expressionsänderungen in den LCLs zu analysieren, da die geringen Regulationen signifikant detektiert werden können. Dies wurde bereits in der Literatur bestätigt. Knowles et al geben an, einen Expressionsunterschied von 10 % mit einer statistischen Sicherheit von 95 % ($p < 0,05$) messen zu können (Knowles et al. 2003).

Um das System reproduzierbarer durchführen zu können, wurde in dieser Arbeit eine modifizierte Variante der isoelektrischen Fokussierung durchgeführt. Da die Reproduzierbarkeit bei Verwendung von Trägerampholyten, die den pH-Gradienten bilden, sehr schlecht ist, wurde das von Görg *et al.* entwickelte IPG-System (*immobilized pH gradient*) verwendet (Gorg et al. 1988). Hier werden verschiedene Acrylamidderivate in einem Gel polymerisiert, wodurch ein immobilisierter und sehr stabiler pH-Gradient generiert wird. Das Limit der möglichen Auflösung liegt bei 5000 Spots pro Gel, die durch unterschiedliche, sensitive Färbemethoden sichtbar gemacht werden können (Neuhoff et al. 1990, Rabilloud et al. 1994). Trotz des großen Separationspotenzials können starke Spots durchaus schwache Spots überlappen, bzw. völlig maskieren. Diese maskierten Spots sind einer quantitativen Analyse nicht mehr zugänglich.

Ca. 2900-3500 abgegrenzte Einzelspots/Gel waren in den Experimenten dieser Arbeit detektierbar. Dies bildete eine gute Voraussetzung für die Identifizierung von Proteinen in der Strahlenantwort.

Es ist darüber hinaus zu beachten, dass nach der zweidimensionalen Auftrennung der Proteine, ein Spot nicht eine einzige Proteinisoform, sondern vielmehr eine Gruppe von Proteinen oder Proteinisoformen repräsentiert, die sich in ihrer Masse und ihrem pI ähneln (Gorg et al. 2004). Dies limitiert die Validierung der Regulationsfaktoren, da in der anschließenden massenspektrometrischen Analyse nicht das regulierte, sondern ein anderes Protein identifiziert werden könnte, welches das gesuchte Protein maskiert. An dieser Stelle könnte eine weitere Auftrennung im betroffenen pH-Bereich weiteren Aufschluss geben, um einen Spot in mehrere Einzelspots aufzutrennen und für den Trypsinverdau ausstechen zu können (Terry und Desiderio. 2003).

Aufgrund des Trennsystems im wässrigen Milieu werden hauptsächlich hydrophile Proteine mit einem GRAVY Index (*grand average of hydropathicity*) kleiner und nahe 1 aufgetrennt, so dass stark hydrophobe Proteine von der 2D-Expressionsanalyse ausgenommen sind. Der GRAVY Index wird berechnet, indem die relative Hydrophilie für jede funktionelle Gruppe addiert wird und die Summe dessen durch die Sequenzlänge dividiert wird (Kyte und Doolittle, 1982).

Neuere, nicht gelbasierte Methoden zur quantitativen Proteomanalyse, wie ICPL (*Isotope-coded protein label*) (Smolka et al. 2001), oder SILAC (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*) (Schmidt et al. 2005) sind komplementäre Verfahren, die die Identifizierung hydrophober und großer Proteine wie ATM und Nbs1 ermöglichen und somit wahrscheinlich zur Identifizierung anderer Proteingruppen geführt hätten. Der dynamische Bereich der Proteinquantifizierung ist bei diesen Verfahren jedoch nicht größer und somit können diese Methoden genutzt werden, um die Liste Proteine der Strahlenantwort zu erweitern.

Ein Vorteil der gelbasierten Methode im Vergleich zu ICPL oder SILAC besteht darin, dass die Visualisierung des Proteinmusters ohne weitergehende Analyse eine qualitative Einschätzung der Ergebnisse erlaubt, da eine schlechte Auftrennung der Spots direkt zu sehen ist. Insbesondere die Softwarebasierte Bildauswertung liefert hier Informationen zur Qualität der Proben. Fehlen in biologischen oder technischen Replikaten einer Probe vollständige Spots, oder sind diese vergleichsweise schlecht aufgetrennt, so wird das bereits vor der Analyse und vor allem der kostenintensiven massenspektrometrischen Analyse deutlich und es können gegebenenfalls neue Proben erstellt, bzw die qualitativ minderwertigen Proben von der Analyse ausgeschlossen werden.

Trotz der vielen manuellen und kritischen Arbeitsschritte bleibt die zweidimensionale Gelelektrophorese eine der leistungsfähigsten Methoden um globale Proteinprofile zu untersuchen. Die größte Herausforderung besteht darin, die nötige Reproduzierbarkeit zu erzielen, um eine verlässliche, robuste Analyse zu gewährleisten. Posch *et al.* konnten zeigen, dass durch die Nutzung der neuesten Methoden (IPG-Streifen, 2D-DIGE), Protokolle und qualitativ hochwertigen Verbrauchsmaterialien die quantitative Datenanalyse gut reproduzierbar ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Varianz zwischen replizierten Gelen innerhalb eines Labors, mit einem Variationskoeffizient (CV) 20 % gering ist. Sogar der inter-Labor Vergleich (3 Labore) zeigt nur eine Varianz von 23 % (Posch et al, 2013). Die Verbrauchsmaterialien und Protokolle die in dieser Publikation beschrieben sind, wurden hier ebenfalls verwendet, da die Protokolle von Anton Posch zur Verfügung gestellt wurden. Die Protokolle zur Lyse und Markierung wurden von Stefan Lehr (Deutsches Diabetes Zentrum, Düsseldorf), der ebenfalls am inter-Laborvergleich beteiligt war, bereitgestellt und in der Praxis von mir in Düsseldorf erlernt.

Alle technischen Verbesserungen im Bezug auf die 2D-Gelelektrophorese zeigen, dass diese Experimente robust und reproduzierbar durchführbar sind.

Die Erfindung der Massenspektrometer ermöglichte die Analyse einzelner Proteine in geringer Konzentration in hoch komplexen Proteingemischen. Bis zum Ende der 80er Jahre stellte die Proteinanalytik jedoch einen limitierenden Faktor dar. Neuerungen in der Massenspektrometrie (MS), wie die Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) und die Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS), ermöglichen die Überführung schwerflüchtiger, fragiler Biomoleküle in die Gasphase, wodurch diese massenspektrometrisch messbar sind. Dies eröffnete ein neues Feld der Proteinanalyse auf individueller und insbesondere auf globaler Ebene. Die Bedeutung der Massenspektrometrie für den Fortschritt auf dem Gebiet der Proteinanalytik wird durch die Vergabe des Nobelpreises 2003 an John B. Fenn und Koichi Tanaka für die Entwicklung der ESI und der MALDI verdeutlicht (Fenn. 2003).

Anhand dieser Technologien ist es möglich, Proteine aufgrund ihrer Peptidmassen zu identifizieren, die hierfür durch tryptischen Verdau in spezifische Peptidfragmente zerlegt werden. Diese Fragmente sind charakteristisch für jedes Protein und werden daher auch als Peptidmassenfingerabdruck (*peptide mass fingerprint*, PMFs) bezeichnet. Um einen Aufschluss über die genaue Aminosäuresequenz der analysierten Peptide zu erhalten, wurde die sog. Tandem-MS (MS/MS) eingeführt, bei der selektiv isolierte Peptide fragmentiert werden, um die Aminosäuresequenz ablesen zu können. Es ist heutzutage auch möglich komplette Proteine, ohne vorherigen proteolytischen Verdau, zu identifizieren (Zubarev et al. 2000).

In dieser Arbeit konnten von den differentiell exprimierten Spots nach MALDI-MS/MS > 70 % der Proteine eindeutig mit einem Mass-Score > 63 identifiziert werden. Trotz mehrmaliger Wiederholung der massenspektrometrischen Analyse konnte die Anzahl der analysierten Proteine nicht erhöht werden. Dies lag mit hoher Wahrscheinlichkeit an der niedrigen Abundanz der Proteine in den zu analysierenden Spots.

Die 2D-gelbasierte Proteinanalyse mit anschließender Massenspektrometrie liefert aufgrund der vielen Arbeitsschritte und deren Limitierungen jedoch nur einen Einblick in die Veränderungen auf Proteinebene nach Bestrahlung und darf in keinem Fall als vollständige Strahlenantwort gewertet werden. Diese Art der Analyse bietet vielmehr einen Überblick über Gemeinsamkeiten und Unterschiede auf Proteinebene und generiert somit weitere Hypothesen, bzw. neue Zielproteine, die durch nachfolgende Experimente untersucht werden müssen.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass der Ansatz 2D-DIGE und MALDI/TOF-MS geeignet ist, um Veränderungen in der Proteinexpression nach Bestrahlung nachzuweisen.

4.4 Western Blot Analyse ausgewählter Kandidatenproteine

Die Genauigkeit der Quantifizierung der Expressionsunterschiede mit Hilfe der 2D-DIGE Technologie konnte in dieser Arbeit bei der Validierung ausgewählter Kandidatenproteine (MCM7, SerpinB9, SND1 und RAD50) im Western Blot bestätigt werden. Der Western Blot ist eine gut etablierte, robuste Methode, um einzelne Proteine in Proteingemischen zu detektieren.

Eine wichtige Thematik der Western Blot-Analyse ist die Normalisierung der generierten Daten. Die Normalisierung basiert üblicherweise auf dem Expressionsniveau sogenannter house-keeping Proteine (HKPs), wie Aktin, Tubulin und Gapdh, die den gesamten Proteingehalt der Zelle repräsentieren sollen. Werden diese Proteine zur Normalisierung herangezogen, ist die Voraussetzung, dass die Expression dieser Proteine in den untersuchten Lysaten stabil ist (Greer et al. 2010).

Die 2D-DIGE Analyse ergab, dass die HKPs Aktin, Tubulin und GAPDH nach Bestrahlung dereguliert sind. So wurde Gapdh in der Linie GM03189(-) nach Bestrahlung mit 1 Gy herunterreguliert. Einige Isoformen von Aktin und Tubulin sind in den untersuchten Linien ebenfalls dereguliert. Dies stellt die Möglichkeit der Nutzung dieser Proteine zur Normalisierung in Frage.

Das Ergebnis der Western Blot-Analyse der Proteine SND1, SerpinB9, MCM7 und RAD50 mit Normalisierung durch eine Ladekontrolle (Aktin/Tubulin) zeigte trotzdem und trotz der niedrigen Regulationsfaktoren eine gute Übereinstimmung mit der Deregulation, die im 2D-DIGE Experiment beobachtet werden konnten.

Dies lässt darauf schließen, dass die Regulationsfaktoren der anderen gefundenen Proteine ebenfalls verlässlich sind.

4.4.1 SND1

Das Protein *Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1* wurde für die Validierung der Expression im Western Blot gewählt, da es als Co-Aktivator der EBNA2 Transkription agiert. Es sollte ausgeschlossen werden, dass die Expression von Genen des Epstein-Barr-Virus für die unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit verantwortlich sind. Die Expressionsunterschiede bezüglich SND1 in den verschiedenen Linien sind jedoch nicht signifikant.

Der Expressionsstatus von EBNA2 (*Epstein-Barr virus nuclear antigen 2*) wurde in den verwendeten Linien am Institut für Strahlenbiologie des Helmholtz Zentrum München ebenfalls im Western Blot getestet (Daten hier nicht gezeigt). Auch hier ist kein Zusammenhang zwischen der Expression und der Strahlensensitivität feststellbar.

4.4.2 SerpinB9

SerpinB9 liegt in der Zelle im Zytosol, im extrazellulären Raum und im Zellkern vor. Neben der Beteiligung an der Immunantwort (Jiang et al. 2006) verhindert es als anti-apoptotisches Protein den Zelltod (Jiang et al. 2007). SerpinB9 wurde als Zielprotein gewählt, da die differentielle Expression dieses Proteins für das unterschiedliche Überleben nach Bestrahlung mitverantwortlich sein könnte. Der Vergleich der SerpinB9-Expression im Western Blot zwischen der strahlensensitiven LUCY-Zelllinie 4060 und der normal reagierenden Linie 20037 zeigt nach 24 h einen signifikanten Unterschied. So ist 24 h nach Bestrahlung die Konzentration von SerpinB9 in der Linie 4060 mit einem Faktor -1,50 signifikant geringer, als in der unbestrahlten Kontrolle, was darauf schließen lässt, dass die Zelle post-Bestrahlung apoptotisch wird. Im Vergleich dazu ist der Expressionsstatus in der Linie 20037 24 h post-Bestrahlung in der Linie 20037 wieder fast entsprechend der unbestrahlten Kontrolle. Dies lässt schlussfolgern, dass die Zelle überlebt. Ob SerpinB9 für die unterschiedlichen Strahlenresistenzen in LCLs mitverantwortlich ist, muss in zukünftigen Versuchen durch *knock-down* Versuche getestet werden.

Die Expressionsunterschiede von SerpinB9 erwiesen sich jedoch in den anderen analysierten LCLs als nicht signifikant.

4.4.3 MCM7

Das *mini chromosome maintenance 7* Protein ist ein Bestandteil des MCM2-7-Heterohexamers. Dieser Komplex bildet wahrscheinlich die replikative Helikase, die dafür verantwortlich ist, dass die Initiation der DNA-Replikation und Elongation nur einmal pro Zellzyklus erfolgt. Darüber hinaus ist bekannt, dass das MCM-Heterohexamer für die Aktivierung des Zellzyklus nach UV-Bestrahlung benötigt wird. Der Hexamer-Komplex bildet einen Ring aus den Untereinheiten MCM2-MCM6-MCM4-MCM7-MCM3-MCM5. Er interagiert mit dem ATR-ATRIP-Komplex und mit RAD17 (Cortez et al. 2004, Tsao et al. 2004). Nach DNA-Schaden wird MCM7 wahrscheinlich von ATM oder ATR

phosphoryliert (Matsuoka et al. 2007). MCM7 ist über die Verbindung zu ATM/ATR direkt in die DDR-Kaskade eingebunden.

Da MCM-Proteine sowohl an der Initiation, als auch an der Elongation der Replikation beteiligt sind, können diese als Zielproteine der DNA Schadenantwort sowohl Initiation, als auch Progression stoppen und sind somit in der Lage bereits gestartete Replikationsursprünge (*origins*, *Oris*) zu modulieren. Darüber hinaus zeigen Cortez et al., dass eine verminderte MCM7-Expression zu einem Defekt im S-Phase-Checkpoint führt, der zu einer strahlenresistenten DNA-Synthese führt.

MCM7 ist in der normalen LUCY-Linie 20037 im Vergleich zur sensitiven 4060 stark herunterreguliert. Dies könnte den strahlenresistenten Phänotyp der Linie 20037 erklären, wenn die verminderte MCM7-Expression zur Überwindung des S-Phase-Checkpoints führt, die DNA-Synthese fortgesetzt wird und somit die Replikation zur Proliferation post-Bestrahlung führt.

4.4.4 RAD50

Die DNA-Schadenantwort ist komplex und verursacht Veränderungen in der Genexpression, Aktivierung der Zellzyklus-Checkpoints und DNA-Reparatur (Dasika et al. 1999, Elledge 1996, Weinert 1998). RAD50 spielt als Bestandteil des MRN (Mre11/RAD50/Nbs1)-Komplexes eine wichtige Rolle in der DNA-Doppelstrangbruchreparatur. Defekte in RAD50 führen zur sog. *Nijmegen-breakage-like disorder* (NBSLD). Dieses Krankheitsbild zeichnet sich durch Chromosomeninstabilität und Radiosensitivität aus (Waltes et al. 2009).

Die Untersuchung der RAD50 Expression im Western Blot ergab, dass RAD50 in der sensitiven Linie GM03189(-) post-Bestrahlung sowohl nach 1 Gy, als auch nach 10 Gy herunterreguliert ist. Nach Bestrahlung mit 1 Gy ist RAD50 ebenfalls in der sensitiven Linie 4060 herunterreguliert. In den übrigen strahlenunempfindlichen Zelllinien HuKo, 20037 und GM03323(+) ist RAD50 nicht signifikant dereguliert. Dies lässt darauf schließen, dass die Herunterregulierung des Proteins RAD50 in den sensitiven Linien für den strahlenempfindlichen Phänotyp verantwortlich ist. Dies entspricht dem Ergebnis einer Studie, in der eine RAD50-Defizienz im Mausmodell zu einer Hypersensitivität gegenüber ionisierender Strahlung führt (Luo et al. 1999).

Ob sich die Deregulation in den weiteren strahlenempfindlichen Linien wiederfindet, muss in zukünftigen Western Blot-Experimenten untersucht werden. Darüber hinaus ist geplant eine Sequenzierung des RAD50-Gens in den Linien durchzuführen.

Die Stain-Free-Technologie bietet die Möglichkeit, die mit Hilfe von HKPs generierten Western Blot-Daten unabhängig von einer Ladekontrolle zu validieren und bietet Vorteile gegenüber der herkömmlichen Gesamtprotein-Färbung (Gürtler et al. 2013). Für die Validierung der RAD50-Expression wurde die Linie GM03189(-) 24 h post-Bestrahlung mit 10 Gy gewählt. Die Deregulation von RAD50 mit dem Faktor – 1,3 konnte mit der SF-Methode bestätigt werden.

Die zweite Western Blot Analyse beweist zuverlässig den, mit der 2D-DIGE Analyse ermittelten, Regulationsfaktor und bestätigt das Ergebnis der ersten Western Blot Analyse, das durch Normalisierung mit Hilfe von HKPs generiert wurde.

Da das Ergebnis der SF-Analyse mit dem der herkömmlichen Western Blot Auswertung übereinstimmt, lässt dies die Schlussfolgerung zu, dass die Regulationsfaktoren aus 2D-DIGE, deren Validierung durch Normalisierung mit HKPs erfolgte, in dieser Arbeit ebenfalls verlässlich sind.

Es zeigte sich, dass die Kombination aus 2D-DIGE und anschließender Validierung mit Western Blot in der Lage ist, auch sehr kleine Unterschiede und Gemeinsamkeiten auf Proteinebene zu detektieren. Dies wird dadurch untermauert, dass die Deregulation der Kandidatenproteine im Western Blot nur in den Linien signifikant nachgewiesen werden konnte, die ebenfalls in der DIGE Analyse signifikant verändert waren.

Obwohl die Stringenz in dieser Arbeit sehr niedrig gewählt wurde, konnten keine aussagekräftigen Ergebnisse, die mit der individuellen Strahlenantwort korrelieren, gefunden werden. Es wird immer deutlicher, dass die ionisierende Strahlung auf der Ebene der posttranslationalen Modifikationen messbar größere Effekte mit sich bringt. Dies ist bereits in Marchetti *et al.* 2006 beschrieben. Es wurden 261 strahlenassoziierte Proteine, davon 173 humane Proteine, beschrieben. Die meisten der berücksichtigten Studien nutzten hohe Dosen (> 4 Gy) und beinhalteten keine Information über die dosis- oder zeitabhängige Veränderung auf Proteinebene. Es wurde jedoch beschrieben, dass die Mehrzahl der Proteine eine erhöhte Anzahl, oder Veränderungen der Phosphorylierungsstellen innerhalb von 24 h nach Bestrahlung, im Bereich von 1,5- bis 10-fach zeigten (Marchetti et al. 2006). Vor allem aus neueren Studien geht hervor, dass

die post-translationalen Veränderungen nach ionisierender Strahlung eher betroffen sind, als die Regulation auf Proteinebene (Wang et al. 2014).

4.5 Differentielle Proteinexpression nach Bestrahlung in unterschiedlich strahlenempfindlichen LCLs

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Literaturrecherche durchgeführt, bei der alle humanen Proteine erfasst wurden, die zwischen den Jahren 2006-2011 in Verbindung mit ionisierender Strahlung publiziert wurden. Die Liste der deregulierten Proteine ist in Pernot *et al.* 2012 veröffentlicht. Die nach IR deregulierten Proteine dieser Arbeit wurden mit den humanen Proteinen aus Marchetti *et al.* 2006 und Pernot *et al.* 2012 verglichen (Marchetti et al. 2006, Pernot et al. 2012). Die Liste umfasst eine Anzahl von 454 Proteinen, wovon 173 Proteine bis zum Jahr 2006 in Marchetti *et al.* beschrieben wurden.

43 der 153 Proteine (22 %), die in dieser Arbeit als dereguliert identifiziert wurden, sind bereits in Verbindung mit ionisierender Strahlung publiziert. Die Regulation der Proteine geht jedoch, wie auch der interindividuelle Vergleich dieser Arbeit zeigte, nicht immer in dieselbe Richtung.

22 der 43 Proteine wurden in mindestens zwei Zelllinien dieser Arbeit als dereguliert beobachtet.

Zu diesen Proteinen gehört ACTB, ACTN4, ALB, ANXA11, ARHGDI1, DARS, DPYSL2, EEF2, ENO1, HSP90B1, HSPA5, HSPD1, LCP1, LDHB, LRPPRC, MSN, P4HB, PDIA3, PPIA, TLN1, UBA1 und VCP. Die verminderte Expression von ARHGDI1 (*Rho GDP-dissociation inhibitor 1*) wurde 4 h und 24 h nach Bestrahlung mit 200 mGy ⁶⁰Co in der humanen endothelialen Zelllinie EA.hy926 beobachtet (Pluder et al. 2011). Diese Herunterregulierung wurde 4 h und 24 h nach Bestrahlung mit 1 Gy sowohl in der normalen Kontrolllinie GM03323(+), als auch nach Bestrahlung mit 10 Gy, zu denselben Zeitpunkten, in der sensitiven Linie GM03189(-) beobachtet. LRPPRC ist ein Strukturprotein, das am mRNA Metabolismus beteiligt ist. Es wurde in resistenten Klonen bestrahlter Tumorzellen im Vergleich zu den Parentalzellen als vermehrt exprimiert beobachtet. Dieselbe Richtung der Deregulation wurde in den Linien HuKo (24 h, 1 Gy), GM03189(-) (24 h, 1 Gy und 4 h / 24 h, 10Gy) und 4060 (24 h, 1 Gy) ermittelt. Lediglich 24 h nach 1 Gy Bestrahlung ist LRPPRC in der Linie 20037 herunterreguliert. MSN, ein weiteres Strukturprotein ist ebenfalls in den resistenten Tumorzelllinien vermindert exprimiert (Smith et al. 2009).

Zu den Proteinen, die hier nur in einer Linie dereguliert waren und bereits publiziert wurden, gehören folgende Proteine: ANXA6, ATP5B, C10orf88, EIF4A1, GAPDH, GFM1, HSP90AA1, HSP90B1, HSPA8, IMPDH2, KARS, LMNA, MYH9, PA2G4, PAICS, PDCD6IP, RAN, STAT1, TPI1, TRAP1, UQCRC1 und VCL. Die Regulation der Proteine ist bei den folgenden Proteinen in die gleiche Richtung beobachtet worden. Eine vermehrte Expression konnte für die ANXA6, EIF4A1, HSP90AB1, PA2G4, PDC6IP, STAT1 und VCL festgestellt werden. Vermindert exprimiert wurden die Proteine ATP5B, LMNA und TCP. Ran (*GTP-binding nuclear protein Ran*) wurde bisher in zwei unterschiedlichen Publikationen als nach Bestrahlung hochreguliert gefunden. Dies stimmt mit der Regulation in der Linie 20037 4 h und 24 h nach 10 Gy Bestrahlung überein. Zum einen wurde dies nach Bestrahlung mit 200 mGy ⁶⁰Co in der humanen endothelialen Zelllinie EA.hy926 beobachtet (Pluder et al. 2011), zum anderen wurde dies in resistenten Prostata Karzinomzellen, im Vergleich zu den Parentalzellen, gefunden (Skvortsova et al. 2008).

Es konnte gezeigt werden, dass viele der Proteine bereits als dereguliert bekannt sind, die in dieser Arbeit identifiziert wurden. Die Heterogenität auf Proteinebene wird durch den Vergleich mit der Literatur noch bekräftigt, da auch hier nur eine vergleichsweise geringe Anzahl von Proteinen mehrfach gefunden wurde. Die größte Gemeinsamkeit besteht, wie auch beim interindividuellen Vergleich der hier untersuchten Zelllinien, in der differentiellen Expression von Chaperonen und Strukturproteinen.

4.6 Bioinformatische Analyse der differentiell exprimierten Proteine aus 2D-DIGE mit der Ingenuity-Software

Jede der Omics-Technologien bietet aufgrund immer sensitiverer Methoden ein wirksames Werkzeug, um Biomarker zu generieren. Die Analyse und anschließende Interpretation stellt jedoch, aufgrund der enormen Datenmenge, eine große Herausforderung dar. Eine Möglichkeit die generierten Datensätze weiter zu analysieren, besteht in der Nutzung von Software-Programmen, die die Ergebnisse biologischen Funktionen und Signal-Netzwerken zuordnen.

Da die hier beobachteten interindividuellen Gemeinsamkeiten gering waren, sollte überprüft werden, ob in Zelllinien mit ähnlichem Phänotyp dieselben Signalwege und Zellfunktionen betroffen waren. Die Zuordnung der deregulierten Proteine in Signalwege ermöglicht zusätzlich

die Generierung neuer Hypothesen, welche Proteine potentielle Kandidaten für einen neuen Biomarker darstellen könnten. In dieser Arbeit wurde die Ingenuity-Software für die Netzwerkanalyse verwendet.

Die rapide Entwicklung der theoretischen, dynamischen Netzwerke während der letzten 4–6 Jahre führte zur Entwicklung zahlreicher Algorithmen und Software-Programme zur Konstruktion, Manipulierung und Analyse von biologischen Netzwerken. IPA ist eines der multifunktionalen Software-Pakete für die Netzwerkanalyse der molekularen Biologie. Bei der “post-Omics” Daten-Analyse findet diese Netzwerk-Analyse häufig Verwendung (Heroux et al. 2014; Shen et al. 2014; Yentrapalli et al. 2013; Shriharshan et al. 2012). Netzwerke bilden die Grundlage in der System-Biologie, um Expressionsänderungen in einem gesamten, integrativen System darzustellen.

Die Auswahl der hier gezeigten Netzwerke und biologischen Funktionen der Proteine und miRNAs basiert bei der Software IPA auf dem einseitigen exakten Fisher-Test. Die IPA-Analyse gleicht die eingespeiste Auswahl von Objekten mit der sog. *IPA Knowledge Base* ab. In dieser ist jedem molekularen Netzwerk, jeder Krankheit und jeder biologischen Funktion, die durch die Software festgelegt ist, ein determinierter Datensatz zugeordnet. Dieser feste Datensatz, der einen spezifischen Endpunkt, wie z.B. „post-translationale Modifikation“ beschreibt, wird aufgrund der Literatur generiert. IPA kalkuliert die Signifikanzen basierend auf der Anzahl von Objekten der zu untersuchenden Liste, die in dem festgelegten Datensatz überrepräsentiert sind.

Werden, wie in dieser Arbeit, < 35 Objekte eingespeist, so werden diese in der Software gleich gewichtet. Bei > 35 Objekten, werden solche Moleküle mehr gewichtet, die in der Literatur am häufigsten dokumentiert sind. Da der 2D-DIGE Ansatz ungerichtet sein sollte und darüber hinaus zu keinem der untersuchten Zeitpunkte > 35 Proteine als dereguliert beobachtet wurden, ist dies hier zu vernachlässigen.

Für die Softwaregestützte Analyse der von mir beobachteten Veränderungen auf Protein- und miRNA-Ebene, wurde eine *IPA Core Analysis* durchgeführt, bei der nur die Veränderung des betroffenen Moleküls, jedoch nicht die Richtung der Veränderung berücksichtigt wird. IPA ist in der Lage die Frage zu beantworten, welche Netzwerke und biologischen Funktionen basierend auf den Protein-/miRNA-Listen signifikant betroffen sind. Der einseitige, exakte Fisher-Test ist für die Zuordnung geeignet, da er keine Voraussetzungen an den Stichprobenumfang stellt. Er ist sowohl für eine große Anzahl von Molekülen, als auch für eine kleine Anzahl (< 10) von Zielmolekülen funktioniell (<http://www.ingenuity.com>).

Der exakte Fisher-Test orientiert sich an der hypergeometrischen Verteilung. Die hypergeometrische Verteilung ist eine diskrete Wahrscheinlichkeitsverteilung in der Stochastik, die die Wahrscheinlichkeit für eine gegebene Anzahl von k Erfolgen bei n -fachem Ziehen aus N Objekten ohne Zurücklegen angibt (dabei sind M der N Objekte als Erfolg klassifiziert). Im Fall der IPA entspricht N der Anzahl der Gesamtheit der Proteine und miRNAs, M entspricht der Anzahl der mit einer Krankheit assoziierten Moleküle, n entspricht der Anzahl deregulierter Objekte und k ist die Anzahl der deregulierten Objekte in M . Wenn die Wahrscheinlichkeit für k hinreichend klein ist, ist der p -Wert signifikant.

Die deregulierten Proteine und miRNAs besitzen keine eindeutige Funktion in der Zelle und liegen in der Software unterschiedlichen Endpunkten (Netzwerken, Krankheiten, Funktionen) zu Grunde. Somit kommt es zu der großen Überschneidung der ausgewählten Objekte, die den unterschiedlichen IPA generierten Funktionen zugeordnet sind, die unter Kapitel 3.5 beschrieben wurden.

Die Zuordnung der deregulierten Proteine in biologische Funktionen der Zelle diene der Veranschaulichung der individuellen Strahlenantwort in den einzelnen Linien. Einen großen Anteil bilden Strukturproteine, die für den Zellaufbau, die Aufrechterhaltung der Zellfunktion, Zellmotilität und die Zellmorphologie bedeutsam sind. Dies weist darauf hin, dass die Strahlenantwort in allen Linien mit einem Umbau der Zellstruktur einhergeht. Darüber hinaus spielen Proteine, die mit Zellüberleben und -tod assoziiert sind, eine wichtige Rolle, ebenso wie Proteine, die für die Proteinfaltung und für posttranslationale Modifikationen verantwortlich sind.

Da nur wenige Proteine gemeinsam zu den untersuchten Zeitpunkten in den Linien exprimiert sind, sind die Zellfunktionen, die die Proteine nach Bestrahlung ausüben, interindividuell sehr unterschiedlich und es sind auch mit diesem Softwaregestützten Analyse-Ansatz keine gemeinsamen Mechanismen innerhalb der strahlensensitiven und der normalen Linien erkennbar. Die Diagramme veranschaulichen jedoch sehr gut, dass im zeitlichen Verlauf der Strahlenantwort nach Bestrahlung mit 10 Gy größere Veränderungen in den Wirkmechanismen der Zelle stattfinden, als nach Bestrahlung mit 1 Gy.

Ionisierende Strahlung, sowie eine Vielzahl weiterer Stressfaktoren, kann viele Signalwege aktivieren, bzw. hemmen. Dies kann einerseits zu erhöhtem Zelltod, oder erhöhter Zellproliferation führen.

Auch anhand der generierten Netzwerke konnte keine Korrelation der Strahlenantwort zum Phänotyp mehrerer Individuen erfolgen. Es ist jedoch möglich, den gemessenen Vitalitätsverlust für jede Zelllinie anhand der Netzwerke zu begründen.

In der normal reagierenden Linie HuKo sind die zentralen Proteine 4 h nach Bestrahlung mit 1 Gy MYC und TP53. Beide Proteine bestimmen, ob die Zelle die Apoptose einleitet, oder weiter proliferiert (Fei and El-Deiry. 2003; Braithwaite et al. 2005; Zamzami und Kroemer. 2005; Helton und Chen. 2007, Riley et al. 2008; Jackson et al. 2011; Li et al. 2012). 24 h nach Bestrahlung ist das zentrale Protein IL6, welches Seneszenz vermittelt. Die Zelle proliferiert nicht, geht jedoch auch nicht zugrunde (Kortlever et al. 2006; Kuilman et al. 2008). 4 h nach Bestrahlung mit 10 Gy sind sehr viele Proteine betroffen, die das Zellüberleben modulieren. AKT, ERK und NFkB sind alle antiapoptotisch gerichtet (Roos und Kaina. 2012; Munshi und Ramesh. 2013; Dent et al. 2003). Das Vorkommen des Proteins HIF1A könnte darauf rückschließen lassen, dass es post-Bestrahlung zu Hypoxie in der Zelle kommt (Moeller et al. 2004; Moeller et al. 2006). 24 h nach Bestrahlung sind die zentralen Proteine TNF und NFkB. Ersteres wirkt proapoptotisch (Ouwens et al. 2001), während NFkB das Gegenteil bewirkt (Dent et al. 2003). Dies lässt vermuten, dass nach 24 h post-Bestrahlung das Schicksal der Zellen noch nicht klar determiniert ist. Sowohl nach 1 Gy, als auch nach 10 Gy Bestrahlung führt die differentielle Proteinexpression nicht unweigerlich zum Zelltod, was den normalen Phänotyp bestätigen könnte.

In der zweiten normal reagierenden Kontrolllinie GM03323(+) konnten nach den hier gewählten Kriterien (Score > 20) nach 1 Gy Bestrahlung keine signifikanten Netzwerke generiert werden. 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy waren TP53 und STAT1 die zentralen Proteine. TP53 entscheidet über Überleben, Apoptose oder Seneszenz, während STAT1 proapoptotisch agiert (Levy et al. 2002; Samuel. 2001). Bei Überexpression führt es jedoch zu Radioresistenz (Khodarev et al. 2004; Khodarev et al. 2007; Weichselbaum et al. 2008). Dies würde das hohe prozentuale Überleben dieser Linie erklären. Die STAT1-Expression zeigte sich aber nach der 2D-Analyse unverändert und müsste im Western Blot verifiziert werden.

In der sensitiven Linie GM03189(-) ist 24 h nach 1 Gy Bestrahlung HIF1A das zentrale Protein, was darauf schließen lässt, dass die Zelle hypoxisch ist. 4 h und 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy sind mit TNF und NFkB jeweils proapoptotische Proteine betroffen. Dies könnte den sensitiven Phänotyp, der mit dem hohen Vitalitätsverlust post-Bestrahlung einhergeht, begründen.

Die sensitive LUCY-Linie 4060 zeigt in beiden Netzwerken (4 h/24 h) nach Bestrahlung mit 1 Gy MYC als zentrales Protein. MYC ist in der Lage, sowohl die Apoptose als auch Proliferation

einzuleiten und kann zur genetischen Instabilität beitragen. Nach Bestrahlung mit 10 Gy ist nach 4 h und 24 h TP53 betroffen. Da nach 24 h zusätzlich das proapoptotische TNF im Netzwerk auftritt, ist es wahrscheinlich, dass die Zellen in den Zelltod übergehen. Dies korreliert mit dem gezeigten Vitalitätsverlust in dieser Zelllinie.

Die normal reagierende LUCY-Linie 20037 zeigte nach beiden applizierten Dosen die größten Unterschiede in der Proteinexpression und es konnten zu allen drei Zeitpunkten signifikante Netzwerke generiert werden. Nach Bestrahlung mit 10 Gy sind zuerst die sowohl proapoptotisch, als auch proliferierend wirkenden Proteine MYC und TP53 zentral, nach 4 h bleibt TP53 und der antiapoptotisch agierende Transkriptionsfaktor NFkB kommt hinzu und bleibt als einziges zentrales Protein 24 h nach Bestrahlung im Netzwerk erhalten. Dieser Verlauf, MYC bei 0,5 h, TP53 nach 4 h und NFkB nach 24 h zeigt sich ebenfalls nach der Bestrahlung mit 1 Gy. Diese Beobachtung könnte das gute Überleben nach Bestrahlung erklären.

Obwohl es anhand der Netzwerke möglich ist, die Proteine mit dem Phänotyp zu korrelieren ist klar, dass der interindividuelle Vergleich anhand der Softwarebasierten Funktionen und Netzwerke aufgrund der o.g. Schwierigkeiten bei der Klassifizierung nicht hundertprozentig stichhaltig ist, da die Überlappung einzelner Proteine in den Kategorien viel zu groß ist.

4.7 Analyse der miRNA-Expression nach ionisierender Strahlung

Seit der Entdeckung der miRNAs und ihrer Funktion als Regulator der Genexpression, wurde die differentielle miRNA Expression in einigen Zellsystemen und einem breiten Dosisbereich getestet und ihre Rolle in der IR-induzierten Schadenantwort bestätigt (Dickey et al. 2011). Die in dieser Arbeit durchgeführten miRNA-Expressionsanalysen zeigen, dass nach einer Bestrahlung mit 10 Gy in lymphoblastoiden Zelllinien eine Reihe von miRNAs differentiell exprimiert werden. Die sowohl erhöhte, als auch verminderte miRNA-Expression in den LCLs lässt darauf schließen, dass Zieltranskripte post-IR sowohl hoch-, als auch herunterreguliert werden. Der Vergleich der intraindividuellen miRNA-Expression zu den beiden untersuchten Zeitpunkten 4 h und 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy ergab mit einer Übereinstimmung von 5,6 % in der Linie GM03323(+) und 15 % in der Linie GM03189(-) eine relativ geringe Überlappung der miRNA-Expression. In der

Linie 20037 sind 13 % der miRNAs zu beiden Zeitpunkten gemeinsam differentiell exprimiert. Nur in der Linie 4060 sind mit 25 % die meisten miRNAs zu beiden Zeitpunkten identisch. Da die miRNA-Analyse in den Linien 4060 und 20037 nur einmal durchgeführt wurde, sind die Daten als vorläufig zu betrachten und nicht verlässlich, da eine Wiederholung nötig wäre, um falsch-Positive auszuschließen.

Beim Vergleich der miRNA-Expression der Linien GM03189(-) und GM03323(+) sind zum Zeitpunkt 4 h nur die miRNAs miR-425 und let-7a in beiden Linien herunterreguliert. Nach 24 h ist weiterhin let-7a herunterreguliert. MiR-34a ist nach 24 h in beiden Linien differentiell exprimiert, wobei die Regulation gegensätzlich ist. In der sensitiven Linie GM03189(-) ist sie herunterreguliert, in der Linie GM03323(+) hochreguliert. Die Rolle der miR-34-Familie in der Stressantwort ist gut dokumentiert. Aktiviertes p53 induziert die Expression von miR-34a/b/c (Rokhlin et al. 2008; Tarasov et al. 2007; Chang et al. 2007). miR-34a/b/c herunterregulieren CDK4 und CDK6, um den Zellzyklusarrest zu induzieren. miR34a unterdrückt HDM4, einen negativen Regulator von p53. Dies führt zu einer positiven Rückkopplungsschleife zu p53. Der Verlust von miR-34a führt zum Verlust des Tumor-Suppressor-Effekts dieser Rückkopplung und zu einer erhöhten Tumorgenese (Okada et al. 2014). Die verminderte Expression von miR-34a in der ATM-defizienten Linie könnte an der Ausbildung des strahlenhypersensitiven Phänotyps beteiligt sein.

Wie auch schon bei der differentiellen Proteinexpression, sind auch bei der miRNA-Analyse nur wenige Gemeinsamkeiten im Expressionsmuster zu beobachten.

Der geringe Anteil gemeinsamer intraindividuell exprimierter miRNAs lässt auf eine unterschiedliche und zeitabhängige regulatorische Funktion der miRNAs in der Strahlenantwort schließen, wobei eine frühe und eine späte Reaktion auf Strahlung zu erkennen ist.

Der Vergleich der interindividuell gemeinsam deregulierten miRNAs bestätigt, dass die interindividuellen Unterschiede auf Proteomebene, ebenfalls auf miRNA-Ebene detektierbar sind. Die interindividuell geringen Gemeinsamkeiten im Expressionsmuster lassen darauf schließen, dass wie auf Proteomebene, jede Linie die Strahlenantwort individuell moduliert.

Um herauszufinden, ob es in der Strahlenantwort einige ubiquitäre Expressionsmuster gibt, wurden die in diese Arbeit gefundenen miRNAs der LCLs mit den Expressionsdaten aus Girardi *et al.* 2012 verglichen (Girardi et al. 2012). In dieser Arbeit wurden humane, periphere Lymphozyten (PBLs) mit 0,2 Gy und 2 Gy bestrahlt und die miRNA-Expression zu den identischen Zeitpunkten, 4 h und 24 h, analysiert. Der Vergleich nach 4 h ergibt 9 gemeinsame miRNAs (miR-16, miR-21,

miR-221, miR-339-3p, miR345, miR425, miR-483-5p, miR-494 und miR-886-3p) in humanen PBLs und LCLs. 24 h post-Bestrahlung sind ebenfalls 9 miRNAs (miR-101, miR-10a, miR-181a, miR-19b, miR-210, miR-330-3p, miR-34a, miR-886-3p und miR-99a) identisch, wobei miR-34a in allen LCLs differentiell exprimiert ist. Die Gemeinsamkeiten im Expressionsmuster deuten an, dass diese miRNAs in der Strahlenantwort im Normalgewebe eine Rolle spielen.

Die miRNA-Expressionsanalysen wurden mit einem Array durchgeführt, um einen Gesamtüberblick über die exprimierten miRNAs zu erhalten. Die Expressionsdaten der miRNAs müssen in zukünftigen Analysen mit einer weiteren Methode, wie PCR (mit einem Single Primer Assay), validiert werden, um die Deregulation eindeutig beurteilen zu können.

4.8 Bioinformatische Netzwerkanalyse der deregulierten Proteine und miRNAs 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy in den Linien GM03323(+) und GM03189(-)

Bei der Ingenuity Netzwerkanalyse zeigte sich für die Linie GM03323(+), dass die deregulierten Proteine und miRNAs die Zielproteine der Netzwerke, die nur anhand der deregulierten Proteine generiert wurden, bestätigen.

Im Vergleich dazu sind in den beiden Pathways der Linie GM03189(-) Proteine und miRNAs dereguliert, bei denen in Kombination die Proteine MYC und AGO2 eine Rolle spielen.

Die Rolle von MYC, als Mediator von Apoptose oder Proliferation wurde bereits beschrieben. Der Bezug von MYC zur genomischen Instabilität passt zu dem Phänotyp der ATM-defizienten Linie, da die Zellen der Träger dieses Gendefekts sich durch genomische Instabilität auszeichnen.

Argonaut 2 (AGO2) ist in den Mechanismus der RNA-Interferenz involviert (Doench et al., 2003). Die Reduktion des Proteins Ago2 führte nach Bestrahlung sowohl bei primären Zellen, als auch bei der Zelllinie EA.hy926 zu einer reduzierten Überlebensrate (Kraemer et al. 2011). Da die miRNAs, die in diesem Netzwerk mit AGO2 interagieren hochreguliert sind, folglich AGO2 herunterreguliert wird, könnte dies in der sensitiven lymphoblastoiden Zelllinie ein Grund für die schlechte Überlebensrate nach Bestrahlung sein.

Da die kombinierte Netzwerkanalyse der beiden Linien deutliche Unterschiede in den Signalwegen zeigte, unterstützt dies weiter die Hypothese, dass die individuelle Strahlenantwort sehr heterogen ist.

4.9 Biomarker für Strahlenempfindlichkeit

Für die Mehrzahl humaner Erkrankungen sind die existierenden Biomarker ungeeignet für die (Früh-) Erkennung der Erkrankung, da sie nicht sensitiv und spezifisch genug sind (Elrick et al, 2006). Daher werden verschiedene Methoden zur Identifizierung von Biomarkern eingesetzt und ein sogenannter systembiologischer Ansatz verwendet, in dem versucht wird, Daten aus mehreren, unterschiedlichen Quellen (Genomics, Proteomics, Metabolomics) zu korrelieren.

Die große Heterogenität lässt mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden eine Generierung von möglichen Biomarkern für Strahlenempfindlichkeit nicht zu. Sie dienen lediglich dazu, Hypothesen zu generieren, die in weiteren Analysen mit weiteren Methoden überprüft werden müssen.

Falls ein spezifischer Marker für Radiosensitivität existiert, muss er interindividuell eingesetzt werden können. Deshalb ist es sinnvoll, große Kollektive, sowie sehr sensitive Methoden für die Biomarker-Suche zu verwenden (Hu et al, 2005).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich, dass die Variabilität der Strahlenantwort auf verschiedenen zellulären Ebenen intraindividuell gering ist. Interindividuell können jedoch kaum Gemeinsamkeiten detektiert werden, die einen eindeutigen Bezug zu ionisierender Strahlung, bzw. dem strahlenempfindlichen Phänotyp zulassen. Rashi-Elkeles *et al.* 2011 untersuchten die Strahlenantwort auf mRNA-Ebene in fünf humanen Zelllinien. In dieser Studie zeigte sich ebenfalls, dass die Mehrheit der deregulierten Transkripte zelllinienspezifisch war (Rashi-Elkeles et al. 2011).

Die zelluläre Antwort auf DNA-Schaden besteht aus einem Netzwerk, das wohl am stärksten durch Proteinmodifikationen reguliert wird (Bekker-Jensen et al. 2010; Ciccia und Elledge. 2010; Polo und Jackson. 2011). Die interindividuelle Variabilität wurde in den Linien dieser Arbeit auch auf DNA-Ebene, durch Analyse von Histon-Modifikationen, in den lymphoblastoiden Zelllinien

beobachtet. Hier zeigte sich deutlich, dass die post-translationalen Modifikationen die Reparaturkapazität beeinflussen.

Im Vergleich zu den untersuchten Proteinen und miRNAs, scheint auf Ebene der PTMs eine Korrelation zum Phänotyp möglich (Maroschik et al. 2013).

5. Material

Die zur Durchführung der Versuche verwendeten Materialien, Geräte und Computerprogramme sind tabellarisch aufgeführt.

5.1 Geräte, Chemikalien und Computerprogramme

5.1.1 Geräte

^{137}Cs - γ -Zelle	HWM-D 2000, Waelischmüller, Germany
7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Alpha Innotech <i>FluorChem HD2</i>	Alpha Innotech
Cedex automated cell counter	Roche Diagnostics, Mannheim
Durchflußzytometer	BD LSRII, Becton Dickinson, USA
Einfrierbox „Mr. Frosty“	Nalgene, Wiesbaden
Eismaschine AF10	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA
ElektroBlotter	BioRad, München
– Criterion™ Blotter (Tank Blotter)	
– Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	
– Trans-Blot® Turbo™	
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Göttingen
Gelkammer Criterion Cell	BioRad, München
Gießstand <i>DALTwelve</i> Gel Caster	GE Healthcare, Freiburg
Glasplatten, low-fluorescence 27 × 21 cm, für Ettan DALT	GE Healthcare, Freiburg
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Göttingen
PCR-Gerät	Cyclone gradient, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Fotometer	BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg
Scanner 1D-Gelelektrophorese	BioRad, München
– Molecular Imager FX	
– GS-800 Scanner	
– GelDoc EZ Imaging System	
– ChemiDoc MP Imaging System	
Spannungsquellen	BioRad, München
SpeedVac Zentrifuge	Thermo Science

Sterilwerkbank Lamin Air HL 2448	Heraeus, Hanau
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Thermomixer 5436	BioRad, München
Typhoon Trio™ Scanner	GE Healthcare, Freiburg
Zentrifuge 5180R	Eppendorf, Hamburg

5.1.2 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid	BioRad, München
Agarose, low-melting	SERVA, Heidelberg
Ammoniumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumchlorid	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ammoniumhydrogencarbonat	VWR, Darmstadt
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ampicillin	Serva, Heidelberg
APS	Merck KGaA, Darmstadt
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Bradford-Reagenz	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Bromo-2'-deoxyuridin	SERVA, Heidelberg
Bromphenolblau	Roche Molecular Diagnostics, Mannheim
BSA	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Calciumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
CHAPS	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Coomassie Biosafe	BioRad, München
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
DMF	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DMSO	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
DTT	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol absolut	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
FKS hitzeinaktiviert	PAA Laboratories, Österreich
Flamingo Fluorescent Gel stain 10x	BioRad, München
Glycerin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Harnstoff	Merck KGaA, Darmstadt
HEPES	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Imidazol	AppliChem, Darmstadt

Iodacetamid	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	VWR, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
L-Lysin Monohydrochlorid	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Magermilchpulver	ROTH GmbH, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Fluka, Buchs (Schweiz)
Natriumcitrat	ROTH, Karlsruhe
Natriumthiosulfat	AppliChem, Darmstadt
Nonidet-P40	Roche, Basel, Schweiz
NOV	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Phosphate buffered saline (PBS)	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Phenol/Chloroform (5:1), pH 4,5	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche, Basel, Schweiz
PMSF	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Basel, Schweiz
RPMI 1640	Biochrom AG, Berlin
Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt
Salzsäure	Merck KGaA, Darmstadt
SDS	Serva, Heidelberg
TEMED	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Thioharnstoff	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Trinatriumcitrat	Merck KGaA, Darmstadt
Tris-HCl pH 8.8	BioRad, München
Trypsin, Proteomics Sequencing Grade	SIGMA-ALDRICH, Schnellendorf
Tween-20	BioRad, München
beta-Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Vectashield – mounting medium	Linaris, Westheim-Bethingen

5.1.3 Computerprogramme

Verwendung	Programm	Hersteller
2D-Spot-Analyse	DeCyder™ 2-D Differential Analysis Software	GE Healthcare
Western Blot (Fluoreszenz)	QuantityOne™	BioRad
Western Blot (Chemilumineszenz)	ImageLab™	BioRad
DIGE-Gel Scan	Typhoon Scan control software	GE Healthcare
Cy-Dye Scanner-Einstellungen	ImageQuant™	GE Healthcare
Proteinanalyse	ProteinPilot™ Software 4.0	ABSCIEX
Proteinidentifizierung	Mascot Server	Matrix Science, UK
mFISH-Analyse	Isis™	MetaSystems
Literaturrecherche	http://www4.ncbi.nlm.nih.gov/ PubMed	
Textverarbeitung	Microsoft® Word 2007	Microsoft
Tabellenkalkulation / Diagramme	Microsoft® Excel 2007	Microsoft
Abbildungen	Microsoft® Powerpoint 2007	Microsoft

5.2 Verwendete Lösungen und Puffer (Lösung/Puffer-Zusammensetzung/Hersteller)

Für molekularbiologische Anwendungen wurde deionisiertes Wasser verwendet (Millipore)

Lysispuffer DIGE	Für 100 ml
7 M Harnstoff	42 g Harnstoff
2 M Thioharnstoff	15,2 g Thioharnstoff
4 % CHAPS	4 g CHAPS
25 mM Tris	0,3 g Tris
Rehydratisierungslösung	Für 100 ml
6 M Harnstoff	36 g Harnstoff
2 M Thioharnstoff	15,2 g Thioharnstoff
100 mM DTT	2 g CHAPS
2 % CHAPS	200 mg DTT
0,5 % (v/v) Pharma-Lyte, pH 3-10	500 µl Pharma-Lyte, pH 3-10
Bromphenolblau zur Färbung	Einige Körner

Markierung	Dye-Stock solution	Working solution 400 pmol
CyDye DIGE Fluor (GE Healthcare)		
Cy2 minimal dye	1 nM / μ l (25 nmol Dye +25 μ l DMF)	2 μ l Dye-Stock solution + 3 μ l DMF
Cy3 minimal dye	1 nM / μ l (25 nmol Dye + 25 μ l DMF)	2 μ l Dye-Stock solution + 3 μ l DMF
Cy5 minimal dye	1 nM / μ l (25 nmol Dye + 25 μ l DMF)	2 μ l Dye-Stock solution + 3 μ l DMF
Stoppen der Markierung	Für 10 ml	
10 mM Lysin	0,018 g	
Äquilibrierlösung	Für 100 ml	
6 M Harnstoff	36 g Harnstoff	
30 % Glycerin	30g Glycerin	
2 % SDS in 0,05 M Tris/HCl, pH 8,8	2 g SDS in 3,3 ml Tris/HCl, pH 8,8	
Acrylamidlösung	Für 100 ml	
Acrylamid	29,2 g Acrylamid	
N,N´-Methylenbisacrylamid	0,8 g N,N´-Methylenbisacrylamid	
Trenngelpuffer	Für 500 ml	
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	90,83 g Tris	
	HCl zum Einstellen des pH-Wertes	
	Fertiglösung von BioRad	
SDS-Lösung	Für 100 ml	
10 % SDS (w/v)	10 g SDS	

Material

SDS-Lösung zum Überschichten der Gele

Für 100 ml

0,1% SDS (w/v)

0,1 g SDS

Ammoniumpersulfatlösung

Für 5 ml

500 mg Ammoniumpersulfat

10x Elektrophoresepuffer

Für 5000 ml

0,1 % SDS

50 g SDS

0,025 M Tris

151,5 g Tris

0,192 M Glycin

720 g Glycin

Agarose zum Fixieren der IPG-Streifen

Für 100 ml

0,8 % Agarose in 1x Elektrophoresepuffer

0,8 g Agarose

Bromphenolblau

Einige Körner Bromphenolblau

DTT für Äquilibration

Für 30 ml

1 % DTT (w/v) in Äquilibrationlösung

300 mg DTT

Jodacetamid für Äquilibration

Für 30 ml

260 mM Jodacetamid in Äquilibrationlösung

1200 mg Jodacetamid

Material

SDS-Gel für 2. Dimension	Für 1000 ml
Glycerin 100 %	50 g
Acrylamid	422 ml
H ₂ O dest.	273 ml
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	250 ml
10 % SDS-Lösung	10 ml
10 % APS (100 mg/ml -frisch)	5 ml
TEMED	60 µl
Verdrängungslösung	14 Gele
50 % Glycerin	100 ml
Fixierlösung	Für 1000 ml
30 % Ethanol	300 ml Ethanol
10 % Essigsäure	100 ml Essigsäure
Towbin Puffer	Für 2000 ml
	200 ml TG-Puffer (10x)
20 % Methanol -4 °C	400 ml Methanol -4 °C
TG-Puffer 10x	Für 5000 ml
25 mM Tris-Base	151,5 g Tris-Base
192 mM Glycin	720 g Glycin

Material

Blockpuffer für Fluoreszenz

Für 500 ml

1x TBS

1 % BSA

5 mg BSA

1 % PVP40

Blockpuffer für Chemilumineszenz

Für 500 ml

1x TBST

5 % Magermilchpulver

25 mg Magermilchpulver

1x TBS

Für 1000 ml

10x TBS (BioRad)

100 ml

1x TBST

Für 1000 ml

1x TBS

990 ml

0,1 % Tween 20

10 ml Tween 20

Lösung für AK-Verdünnung

Für 100 ml

5 % BSA in 1x TBST

5 mg BSA

RIPA Puffer (Sigma)

50 mM Tris-HCl, pH 8.0

150 mM NaCl

1 % NP-40

0,5 % Natriumdeoxycholat

0,1 % SDS

Lämmli 3x pH 7.5 (mit HCl einstellen)

Für 100 ml

75 mM TRIS-HCl, pH 8.8

0,9 g TRIS-HCL

6 % SDS

6 g SDS

45 % Glycerin

45 g Glycerin

3 % DTT

3 g DTT

Bromphenolblau

einige Körner Bromphenolblau

5.3 Kommerzielle Kits

Alkalische Phosphatase Substrate Kit

BioRad, München

Cell Proliferation Reagent WST-1

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Cleaning Solution Refill

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Colcemid Solution

SERVA, Heidelberg

DAPI/antifade

MetaSystems, Altlußheim

Detergent Solution Refill

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Immun-Star WesternC Goat anti-Mouse

BioRad

(GAM)-HRP detection Kit

Lipofectamine™ 2000

Invitrogen, Karlsruhe

Lipofectamine™ RNAiMax	Invitrogen, Karlsruhe
Megaplex RT Primer Human Pool A V 2.1	Applied Biosystems, New Jersey, USA
TaqMan® Micro RNA Assay	Applied Biosystems, New Jersey, USA
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Foster City, CA
TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG	Applied Biosystems, New Jersey, USA
Trypan Blue Solution Refill	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Restore™ Plus Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, Rockford, USA
RNaseA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
MirVana™ miRNA Isolation Kit	Ambion, Austin, USA
Precision Plus Standard unstained™	BioRad, München
Precision Plus Protein™ Dual Color Standard	BioRad, München
Precision Plus STD Kaleidoscope™ Standard	BioRad, München
RC DC Protein Assay Kit II	BioRad, München
RIPA Puffer	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
24Xyte Human Multicolor FISH (mFISH) Probe Kit	MetaSystems, Altlußheim

5.4 Verbrauchsmaterialien

Blot-Membranen	BioRad, München
Deckgläser, 18 x 18 mm	neoLab, Heidelberg
Filterpapier, Trans Blot 15 x 20 cm	BioRad, München
Gele (1D-Gelelektrophorese)	BioRad, München
<ul style="list-style-type: none"> – Criterion™ SFX, any kD, 18 well – Criterion™ TGX Stain-Free™ Precast Gels, 18 well 	

- Mini-Protean TGX, any kD, 10 well

IPG-ReadyStrip pH 3-10NL, 17 cm	BioRad, München
Objektträger 76 x 26 mm	neoLab, Heidelberg
Reaktionsgefäße 1-2ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 15 ml; 50 ml	neoLab, Heidelberg
Zellkulturflaschen, steril	Nunc, über neoLab, Heidelberg
96-well Platten	Greiner Bio-one, Frickenhausen

5.5 Verwendete Antikörper und Verdünnungen

Primäre Antikörper	Wirt	Größe (kDa)	Mono-/Polyklonal	Bestellnr	Verdünnung	Bezugsquelle
Aktin AC-40	Maus	42	Mono	T6074-200UL	1 / 5000	SIGMA
Gapdh	Kaninchen	37	Mono	2118	1 / 5000	Cell Signaling
Tubulin Clone B-5-1-2	Maus	50	Mono	A3853-200UL	1 / 10000	SIGMA
MCM7	Maus	80	Mono	ab2360	1 / 500	Abcam
RAD50	Maus	150	Mono	ab89	1 / 1000	Abcam
SerpinB9	Maus	42	Mono	ab46533	1 / 250	Abcam
SND1	Maus	101	Mono	ab70422	1 / 1000	Abcam
Sekundäre Antikörper						
α -Maus	Ziege	-----	Mono	-----	1/10000	BioRad
α -Kaninchen	Ziege	-----	Mono	-----	1/10000	Sigma

5.6 Zelllinien und Zellkulturmedien

Bei allen in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien handelt es sich um EBV-transformierte humane B-Lymphozyten, sogenannte lymphoblastoide Zelllinien. Alle verwendeten Zelllinien wurden am HMGU transformiert.

5.7 Kontroll-Zelllinien

Zelllinie	Ort der Transformation	Bezugsquelle
GM01839 (ATM-)	unbekannt	Coriell, USA
GM03323	unbekannt	Coriell, USA
HuKo	BfS	

5.8 Zellkulturmedium

Vollmedium	Für 100 ml
RPMI 1640	89 ml RPMI 1640
10 % FKS (hitzeinaktiviert)	10 ml FKS
1 % Penicillin/ Streptomycin	1 ml P/S
Kryomedium	Für 100 ml
RPMI 1640	70 ml RPMI 1640
20 % FKS	20 ml FKS
10 % DMSO	10 ml DMSO

6 Methoden

6.1 Zellbiologische Methoden

6.1.1 Kultivieren, Vermehren und Passagieren einer Suspensionszellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen, unter einer Laminar-Flow durchgeführt. Kultivierung der lymphoblastoiden Zelllinien erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ in sterilen Zellkulturflaschen. Die Zelllinien wurden mit $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml ausgesät und die Zellzahl alle 2-3 Tage bestimmt. In der logarithmischen Phase wurden sie 2x/Woche im Verhältnis 1:3 passagiert. Hierfür wurde die Zellsuspension gut resuspendiert und die Zellen 10 min bei 200 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde in frischem Vollmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

6.1.2 Kryokonservierung von Säugerzellen

Die Kryokonservierung erfolgte in Aliquots von je 3 oder 5×10^6 Zellen/ml. Die einzufrierenden Zelllinien befanden sich in der logarithmischen Wachstumsphase. Die Zellsuspension wurde 10 min bei 200 x g zentrifugiert und das Sediment in gekühltem Einfriermedium aufgenommen. Da Säugerzellen mit einer Abkühlrate von 1 °C/min eingefroren werden sollen, wurden die Gefäße in einem Kryobehälter 24 h bei -80 °C gelagert. Anschließend wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

6.1.3 Auftauen von humanen Zellen

RPMI Vollmedium wurde auf 37 °C vorgewärmt. Die Zellen wurden aus dem Stickstofftank entnommen, im Wasserbad aufgetaut und in Zellkulturflaschen (25cm²) mit Vollmedium überführt, so dass die Konzentration mit $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml betrug.

6.1.4 Zellzahlbestimmung lymphoblastoider Zelllinien

Ein Hämozytometer (Neubauer Zählkammer) wurde so mit einem Deckglas versehen, dass Newtonsche Ringe erschienen. Die Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:10 mit einer Trypanblaulösung (w= 0,5 %) gemischt und bei RT 2-3 min inkubiert. Danach wurden die Zellen nochmals vorsichtig resuspendiert und in die Zählkammer pipettiert. Hier wurde das Über-, bzw. Unterfüllen vermieden. Zur Auszählung wurde ein Mikroskop mit 10-40 fach vergrößerndem Objektiv genutzt und 4 Eckquadrate ausgezählt. Die Fläche eines Quadrates beträgt 1 mm² und die Höhe zwischen Deckglas und Objektträger beträgt genau 0,1 mm. Das Volumen über jedem der Quadrate beträgt 0,1 mm³ bzw. 0,1 µl (1 mm x 1 mm x 0,1 mm). Nach der Zählung wurde der Mittelwert der Quadrate bestimmt. Um die Anzahl der Zellen/ml zu erhalten, wird der Mittelwert mit dem Faktor 10⁴ und dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Der prozentuale Anteil lebender Zellen errechnet sich wie folgt:

$$\% \text{ lebende Zellen} = \frac{\text{ungefärbte Zellen}}{\text{gefärbte} + \text{ungefärbte Zellen}} * 100$$

Darüber hinaus wurde für die Zählung ein automatisiertes Verfahren (Cedex automated cell counter) verwendet. Die automatisierte Zellzählung basiert, wie die Zählung in der Neubauerzählkammer, auf dem Trypanblau-Ausschlussprinzip. Hierfür wurden 300 µl der resuspendierten Suspensionskultur in ein Reaktionsgefäß gegeben und bei der Einstellung *minimal size* und *standard* automatisch gezählt. Die Zellzählung erfolgt hier über eine graphische Analyse.

6.1.5 Anzucht und Aussaat der Zellen für Trypanblautest und WST-1

Die Empfindlichkeit der verschiedenen LUCY-Zelllinien gegenüber ionisierender Strahlung einer Cs¹³⁷-Quelle, wurde in der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt. Für die Bestrahlungsexperimente wurden die Zelllinien nach dem Auftauen sieben Tage in 75 cm² Flaschen kultiviert und nur solche Linien verwendet, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Die Zelllinien wurden über diese Zeit in der logarithmischen Phase gehalten. Die Linien, die noch in der lag-Phase waren, wurden bis zur exponentiellen Phase weiterkultiviert, eingefroren und erneut aufgetaut. Für die Bestrahlungsversuche wurden die Zelllinien am Vortag passagiert und auf 0,5 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt. Am Tag des Bestrahlungsexperimentes wurden die Zelllinien für die Experimente auf 0,4 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt. Für die Vitalitätsbestimmung nach ionisierender Strahlung wurde pro Zeitpunkt 24 h

bzw. 48 h nach Bestrahlung je eine 25 cm² Zellkulturflasche mit je 5 ml der Zellsuspension gefüllt. Um die Viabilität zu bestimmen, wurde pro Zeitpunkt eine 96-Loch Platte gefüllt. Um die Linearität der Farbentwicklung zu gewährleisten wurde eine Verdünnungsreihe ausgesät. Als Ausgangszellzahl diente die Zellsuspension mit einer Konzentration von $0,4 \times 10^6$ Zellen/ml, die parallel für den Trypanblautest verwendet wurde. Es wurden je 16 Löcher pro Verdünnung gefüllt. Die Verdünnungsreihe erfolgte in 10er Schritten, wobei das Endvolumen pro Loch 100 µl betrug. Um die Extinktion des Mediums von der Gesamtextinktion der Proben abziehen zu können, wurden 8 Löcher mit je 100 µl sterilem Medium gefüllt.

6.1.6 Anzucht und Aussaat für 2D-, bzw. 1D-Gelelektrophorese

Die Zelllinien wurden in 125 cm² Kulturflaschen bis zu einer Zellzahl von $1,2 \times 10^8$ (2D) bzw. 4×10^7 (1D) Zellen mit einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml kultiviert. Am Tag der Bestrahlung wurden die Zelllinien mit einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml und einer Gesamtkonzentration von 3×10^7 (2D) bzw. 1×10^7 (1D) Zellen in 75 cm² Kulturflaschen überführt. Pro Zelllinie wurden 4 Kulturflaschen gefüllt, von denen drei Flaschen bestrahlt wurden.

6.1.7 Anzucht und Aussaat für MikroRNA-Analyse

Die Zellkulturarbeiten und die Bestrahlung wurden am ISB (Helmholtz Zentrum, München) von Anne Krämer durchgeführt.

6.1.8 Anzucht und Aussaat für mFISH-Analyse

Die Zelllinien wurden in 25 cm² Kulturflaschen bis zu einer Zellzahl von 10×10^6 Zellen vermehrt. Für die Analyse wurden die Zellen mit einer Zellzahl von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml in frische 25 cm² Kulturflaschen überführt. Für jede Zelllinie wurden 2 Kulturflaschen verwendet (Doppelbestimmung).

6.1.9 Ernte der Zellen für proteinbiochemische Analysen

Die Proteinexpression nach Bestrahlung wurden zu den Zeitpunkten 0,5 h, 4 h und 24 h untersucht. Hierfür wurden die Zelllinien nach der Bestrahlung für den jeweiligen Zeitraum im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurde die Zellsuspension in sterile 50 ml Röhrchen überführt und bei 4 °C für 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 10 ml RPMI 1640 (ohne FKS) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde ebenfalls abgesaugt, das Pellet in 1 ml RPMI 1640 aufgenommen und in ein zuvor gewogenes Eppendorf-Röhrchen überführt, zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die verbleibenden Wassertropfen wurden vorsichtig mit Zellstoff entfernt, um das Zellnassgewicht genauer bestimmen zu können. Die Röhrchen wurden gewogen, und das Leergewicht abgezogen, um das Zellnassgewicht zu ermitteln. Anschließend wurden die Zellen bis zur Lyse bei -80 °C eingefroren.

6.2 γ -Bestrahlung der Zelllinien an einer ^{137}Cs -Quelle

Die Zelllinien wurden mit Hilfe einer ^{137}Cs -Quelle bestrahlt. Die Dosisrate betrug 1,85 min/Gy. Um die Viabilität und Vitalität der Linien zu bestimmen, wurden die Zelllinien mit einer Dosis von 10 Gy bestrahlt. Für die 2D-Gelelektrophorese, sowie für die 1D-Gelelektrophorese wurden die Zelllinien mit 1 Gy und 10 Gy bestrahlt. Für die Analyse der MikroRNA wurde mit 10 Gy bestrahlt.

6.3 Funktionelle Analysen

6.3.1 Bestimmung der Vitalität (Trypanblau)

Trypanblau ist ein polyanionischer Azofarbstoff mit einer molaren Masse von 960,83 g/mol, der die defekte Zellmembran toter Zellen durchdringt und als Anion mit vier Sulfonatgruppen leicht an zytosolische Proteine bindet. Es wird zur Testung der Lebensfähigkeit von Zellen (Vitalfärbung) eingesetzt und ermöglicht die Bestimmung des Anteils lebender und toter Zellen. Tote Zellen werden blau gefärbt, vitale Zellen bleiben ungefärbt.

Zur Bestimmung des Zellüberlebens nach Bestrahlung wurden die Zelllinien 24 h und 48 h nach Bestrahlung in den Kulturflaschen unter sterilen Bedingungen resuspendiert, und 300 µl für die Zellzahlbestimmung mit Hilfe des Zählgerätes entnommen. Zuvor wurden die Einstellungen der automatisierten Zellzählung der manuellen Vitalitätsbestimmung nach Neubauer angepasst.

6.3.2 Bestimmung der Viabilität (WST-1 Test (water soluble tetrazolium)).

Der Viabilitätstest (Zelllebensfähigkeit) wurde mit Hilfe des WST-1 Kits (Roche) durchgeführt. Die Bestimmung der Proliferationsaktivität nach Bestrahlung erfolgt über ein colorimetrisches Messprinzip. Das schwach rot gefärbte Tetrazoliumsalz WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat), wird von viablen Zellen über das mitochondriale Succinat-Tetrazolium Dehydrogenasesystem enzymatisch in das dunkelrote Formazan umgesetzt. Dieser Farbumschlag ist ein Nachweis für eine aktive Atmungskette der Zellen. Die Messung des Farbumschlags erfolgte über photometrische Extinktionsmessungen bei 240 nm in einem ELISA-Reader. 21 h nach Bestrahlung wurde unter sterilen Bedingungen in jedes Loch 200 µl WST-1 Reagenz gegeben und die 96-Loch Platten weiter im Inkubator unter Normalbedingungen kultiviert. Der Farbstoff ist bis zu 4 h stabil und der Farbumschlag linear zur Anzahl viabler Zellen. Nach 2,5 h im Inkubator erfolgte die erste Messung der Platten und im Anschluss wurde alle 0,5 h eine Messung durchgeführt. Für die Mehrzahl der getesteten Zelllinien erwies sich die Messung nach 3 h als optimaler Zeitpunkt.

6.3.3 Auswertung

6.3.3.1 Bestimmung des Zellüberlebens nach Trypanblaufärbung

Die Anzahl lebender Zellen einer unbestrahlten LUCY-Linie nach 24 h diente als Ausgangskonzentration und wurde auf 100 % gesetzt. Die Anzahl der lebender Zellen 24 h und 48 h nach Bestrahlung wurde prozentual gegen die Anzahl vitaler Zellen der unbestrahlten Kontrolle gerechnet und so das Zellüberleben (%) der jeweiligen Zelllinie nach Bestrahlung bestimmt.

6.3.3.2 Bestimmung der Zellüberlebensfähigkeit nach Behandlung mit WST-1

Für die Berechnung der Viabilität wurde zunächst der Mittelwert der Extinktionen der einzelnen Verdünnungen berechnet und der Mittelwert der Extinktion des Medium von diesem subtrahiert. Die Bestimmung der Viabilität erfolgte wie unter 6.3.2 beschrieben. Die Extinktion der unbestrahlten Linie nach 24 h wurde 100 % gesetzt und die Extinktion der Probe gegengerechnet. Um die Daten des WST-1 Tests mit den Ergebnissen der Trypanblaufärbung vergleichen zu können, wurde für die Auswertung die Extinktion der Proben mit einer Zellzahl von $0,4 \times 10^6$ Zellen/ml verwendet.

6.3.3.3 Kategorisierung der Strahlenempfindlichkeit der LUCY-Zelllinien

Um eine Kategorisierung der Strahlenempfindlichkeit der LUCY-Zelllinien in strahlensensitiv und normal zu erreichen, wurden bei jedem Versuch zusätzlich 2 Kontrolllinien getestet. Bei diesen Linien handelt es sich ebenfalls um lymphoblastoide Zelllinien. Als Kontrolle bezüglich Vitalität und Viabilität für Strahlensensitivität diente die Zelllinie GM03189(-) eines AT-Patienten. Als Kontrolle für normal reagierend, diente die lymphoblastoide Zelllinie GM03223(+) des gesunden Bruders des AT-Patienten, die sich nach allen Bestrahlungsversuchen als vital und proliferationsaktiv herausstellte. Die Einordnung in die zwei oben genannten Kategorien erfolgte über die prozentualen Ergebnisse der Versuche. Wuch das prozentuale Überleben lediglich bis zu $\pm 5\%$ der gemittelten Überlebensdaten der Linie GM03189(-) ab, wurden diese Linien als strahlensensitiv eingeordnet. Lagen die Ergebnisse mit einer maximalen Abweichung von $\pm 5\%$ nahe der Überlebensdaten der Linie GM03223(+), so wurden diese als normal eingestuft.

6.4 MulticolorFISH Analyse (mFISH)

6.4.1 Präparation von Chromosomen

Die mFISH Analyse wurde am BfS in Kooperation mit Susanne Schmeißer durchgeführt. 3 h nach Bestrahlung, wurde das Spindelgift Colcemid mit einer Endkonzentration von 0,03 µg/ml im Medium zugegeben. Die Zelllinien wurden anschließend unter Normalbedingung weiterkultiviert. Nach 48 h wurde die Zellsuspension in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei 200 x g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 0,075 M KCl (37 °C) resuspendiert, 5 min bei RT quellen gelassen und erneut 10 min bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ein Restvolumen von 0,5 ml abgesaugt und verworfen und das Pellet vorsichtig resuspendiert. Nach dem Quellen der Zelllinien wurde tropfenweise kaltes (-20 °C) Carnoy-Fixativ, eine Mischung aus Methanol und Eisessig (Verhältnis 3:1) zugegeben. Hierfür wurden die Röhrchen während der Fixativzugabe kontinuierlich auf einem Vortex-Apparat geschüttelt, um eine gute Durchmischung zu gewährleisten. Das Endvolumen betrug 2-3 ml. Danach erfolgten zwei Waschschrte, wobei die Zellen erneut 2 x wie oben beschrieben in Fixativ pelletiert wurden, der Überstand verworfen und erneut Fixativ zugegeben wurde. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -20 °C eingefroren.

4.4.2 Auftropfen der Chromosomen auf Objektträger

Die Zellen wurden am Vortag der Hybridisierung für die mFISH Analyse aufgetropft. Die verwendeten Objektträger (OT) wurden bei 4 °C in einer Mischung aus Millipore Wasser mit Methanol aufbewahrt. Die Zellen im Fixativ wurden 10 min bei 200 x g pelletiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet mit frischem Fixativ eingestellt, bis die Mischung opaleszierend erschien. Die Zellen wurden aus ca. 10 cm Höhe mit einer Pasteurpipette auf die sauberen, feuchten, gekühlten Objektträger getropft. Beim Auftreffen auf den OT platzen die in der Metaphase befindlichen Zellen und die Chromosomen werden gespreitet. Es wurde ein Tropfen der Suspension verwendet, trocknen gelassen und anschließend im Phasenkontrast die Güte des Präparates begutachtet. Die Dichte der Zellen und Mitosen sollte nicht zu hoch sein und es sollten sich keine Zytoplasmareste auf den Chromosomen befinden. Entsprachen die Präparate nicht den Anforderungen, wurden erneut Waschschrte mit Fixativ durchgeführt und das Endvolumen vergrößert, bzw. verkleinert.

6.4.3 Denaturierung

Für die schonende Denaturierung der Chromosomen wird vom Hersteller der verwendeten mFISH-Sonden (MetaSystems) eine Kombination aus Temperaturerhöhung und pH-Verschiebung empfohlen. Demnach erfolgte als erstes die Inkubation der Objektträger in 2 x SSC-Puffer bei 70 °C für 30 min. Nach einer Abkühlphase von 20 min wurden die OTs in 0,1 x SSC-Puffer überführt und für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend fand der Transfer in 0,07 M NaOH für 1 min bei RT statt. Danach wurden die OTs in 4 °C-kalten 0,1x und 2 x SSC-Puffer überführt, jeweils für 1 min. Zum Abschluss wurden die OTs mit 70 %, 95 % und 100 % Ethanol für jeweils 1 min bei RT dehydriert und anschließend luftgetrocknet.

Parallel fand die Denaturierung der mFISH-Sonden (MetaSystems) statt. Dafür wurde das benötigte Sondenvolumen (7 µl/OT) in ein Reaktionsgefäß pipettiert und im Wasserbad bei 75 °C für 5 min denaturiert. Nach einer kurzen Abkühlphase auf Eis, wurden die Sonden bei 37 °C für 30 min inkubiert (Vorhybridisierung).

6.4.4 Hybridisierung

Die Hybridisierung der Chromosomen erfolgte ebenfalls nach Herstellerangaben (MetaSystems). Dafür wurden die denaturierten und vorhybridisierten Sonden auf die denaturierten OTs pipettiert und mit einem 18 x 18 mm Deckglas abgedeckt. Die Ränder des Deckglases wurden mit Fixogum versiegelt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 24 h in einer feuchten Kammer. Nach der Hybridisierung wurden die OTs in 0,4x SSC-Puffer bei 72 °C für 2 min inkubiert und anschließend für 30 s in 2 x SSC-Puffer mit 0,05 % Tween 20 gewaschen. Um eine Kristallbildung zu vermeiden, wurden die OTs kurz in bidestilliertes Wasser getaucht und anschließend luftgetrocknet. Abschließend wurden die Chromosomen mit DAPI gegengefärbt und die Objektträger mit einem 24 x 50 mm Deckglas abgedeckt.

6.4.5 Visualisierung der Chromosomen

Die Aufnahme der Metaphasen erfolgte mit einem Metafer Scanning System (MetaSystems), das aus dem Zeiss Mikroskop Axiomager.Z2, einem motorisierten Objekttisch für 8 Objektträger (Märzhäuser), einer CCD Kamera (CoolCube-Kamera) und einem Computer mit entsprechender Software besteht. Die OTs wurden mit dem Programm Metafer (MetaSystems) im Betriebsmodus *MSearch Fluorescence* automatisch auf Metaphasen abgesucht (DAPI-Filter). Hierbei kam der vom Hersteller generierte Klassifikator für humane Lymphozyten zum Einsatz. Die identifizierten Metaphasen wurden manuell begutachtet und für die anschließende Aufnahme (in allen Farbkanälen) ausgewählt (Abb.: 6.1).

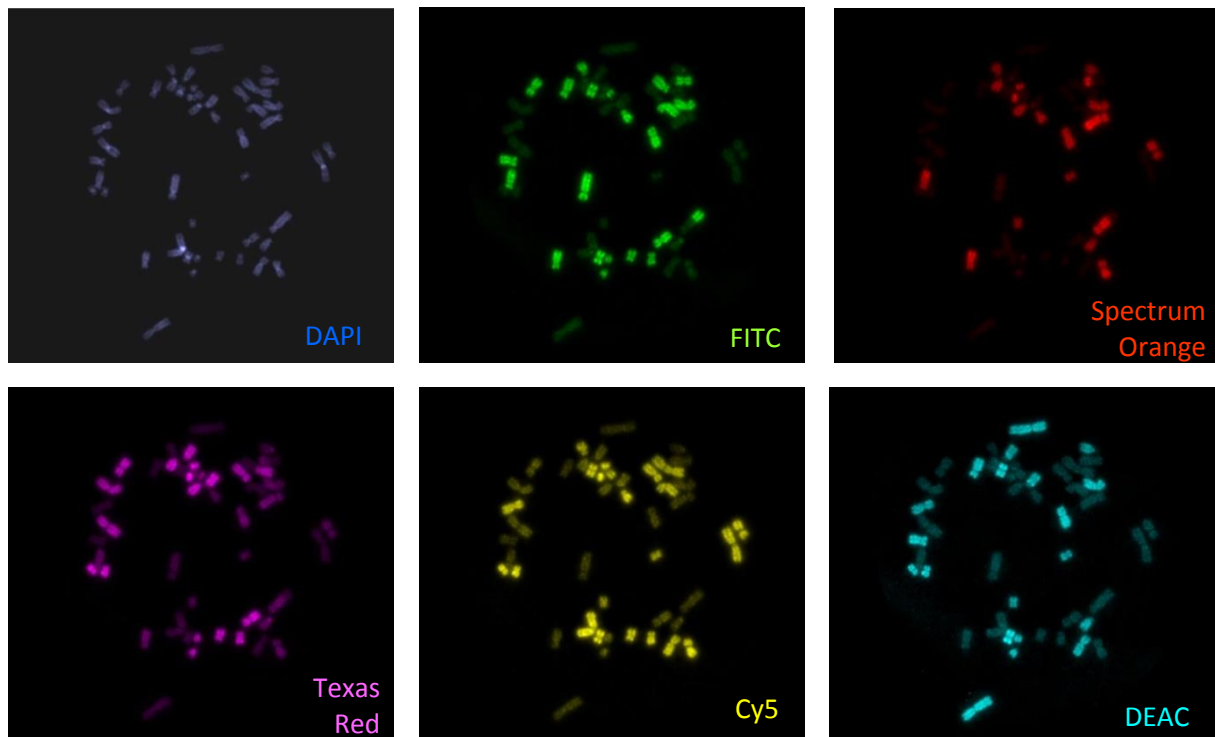


Abbildung 6.1: Visualisierung der Chromosomen in den einzelnen Farbkanälen. In jedem einzelnen Farbkanal ist erkennbar, dass die Sonden nur mit bestimmten Metaphase-Chromosomen hybridisiert sind. Im DAPI-Kanal sind alle Chromosomen sichtbar, da es unspezifisch bindet und als Gegenfärbung genutzt wird.

Selektionskriterien waren die Vollständigkeit und gute Spreitung der Metaphase, sowie die Abwesenheit von Überlagerungen. Die Aufnahme der ausgewählten Metaphasen erfolgte automatisiert im Modus *AutoCapt mFISH* des Programms Metafer mit den vom Hersteller empfohlenen Einstellungen. Für die Analyse der Metaphasen kam das Farbkaryotypisierungsprogramm Isis mit dem Modul mFISH (MetaSystems) zum Einsatz.

6.4.6 Auswertung

In die Auswertung wurden nur vollständige Metaphasen (mit 46 Chromosomen) einbezogen. Für die Karyotypisierung wurden mindestens 50 Metaphasen ausgewertet, wenn der Karyotyp mit 44 Autosomen und 2 Gonosomen weitgehend unverändert war. Für Zelllinien mit größeren Abweichungen vom normalen Karyotyp, wurden > 100 Metaphasen ausgewertet.

6.5 Proteinanalytische Methoden

6.5.1 2D-Gelelektrophorese

6.5.1.1 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Strahlenempfindlichkeit
Kontrollen	
HuKo	Normal
GM03323(+)	Normal
GM03918(-)	Sensitiv
LUCY	
4060	Sensitiv
20037	Normal

6.5.1.2 Herstellung von Gesamtproteinextrakten für die 2D-Gelelektrophorese

Zur Extraktion von Gesamtprotein wurden 6 µl Lysepuffer DIGE/mg Zellnassgewicht eingesetzt. Die eingefrorenen, pelletierten Zellen wurden aufgetaut, mit Lysepuffer resuspendiert und anschließend stark geschüttelt. Um die Zellen vollständig zu lysieren, wurde 4 x 10 sec mit einem Ultraschallstab auf Eis sonifiziert. Das Zelldebris wurde anschließend durch 60-minütige Zentrifugation bei 25000 x g von den gelösten Proteinen getrennt. Der Überstand wurde in ein frisches Röhrchen überführt.

6.5.1.3 Proteinmengenbestimmung der 2D Gesamtproteinextrakte

Die Proteinmengenbestimmung erfolgte nach Herstellerangaben mit dem RC/DC Kit (BioRad) über eine Proteinfällung, da eine direkte Bestimmung des Proteingehalts z.B. mit Bradford Reagenz aufgrund des hohen Harnstoffgehalts der Proben nicht möglich ist. Die Proben wurden 1:10 mit dest. H₂O verdünnt, damit die erwartete Proteinmenge im Bereich der Standardkurve lag. Pro Probe wurden 60 µl der Verdünnung angesetzt, und je 25 µl davon in 2 Eppendorf-Röhrchen überführt (Doppelbestimmung). Die Leerkontrolle wurde, bestehend aus Lysepuffer DIGE und dest. H₂O, in gleicher Weise vorbereitet. Es wurde eine Standardkonzentrationsreihe aus BSA erstellt, wobei aus einer 1450 µg BSA/ml Stammlösung eine Verdünnungsreihe mit 200, 400, 800, 1000 und 1450 µg BSA/ml dest. H₂O hergestellt wurde. Die Absorptionsmessung erfolgte im Photometer bei 750 nm mit 15 Blitzen. Anhand der Standardkurve wurde die Proteinkonzentration der Proben berechnet.

6.5.1.4 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen mit Cyaninfarbstoffen (Marouga et al. 2005)

Bei der differenziellen in-Gel Elektrophorese (DIGE) Methode werden 3 Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlicher Absorption verwendet, wodurch es möglich ist, 3 unterschiedliche Proben auf einem Gel aufzutrennen. Durch DIGE können die individuellen Zustände des Proteoms eines Systems durch den quantitativen Vergleich ihrer Spotmuster erörtert werden.

Bei dieser Technik werden die Proteinproben vor der Elektrophorese mit spektral voneinander getrennten Fluoreszenzfarbstoffen (CyTM Dyes) gekoppelt. Anschließend werden die Proben vor der isoelektrischen Fokussierung zusammengemischt und auf einem einzelnen 2D-Gel aufgetrennt (Minden 2007; Westermeier et al. 2008) (Abbildung 6.2).

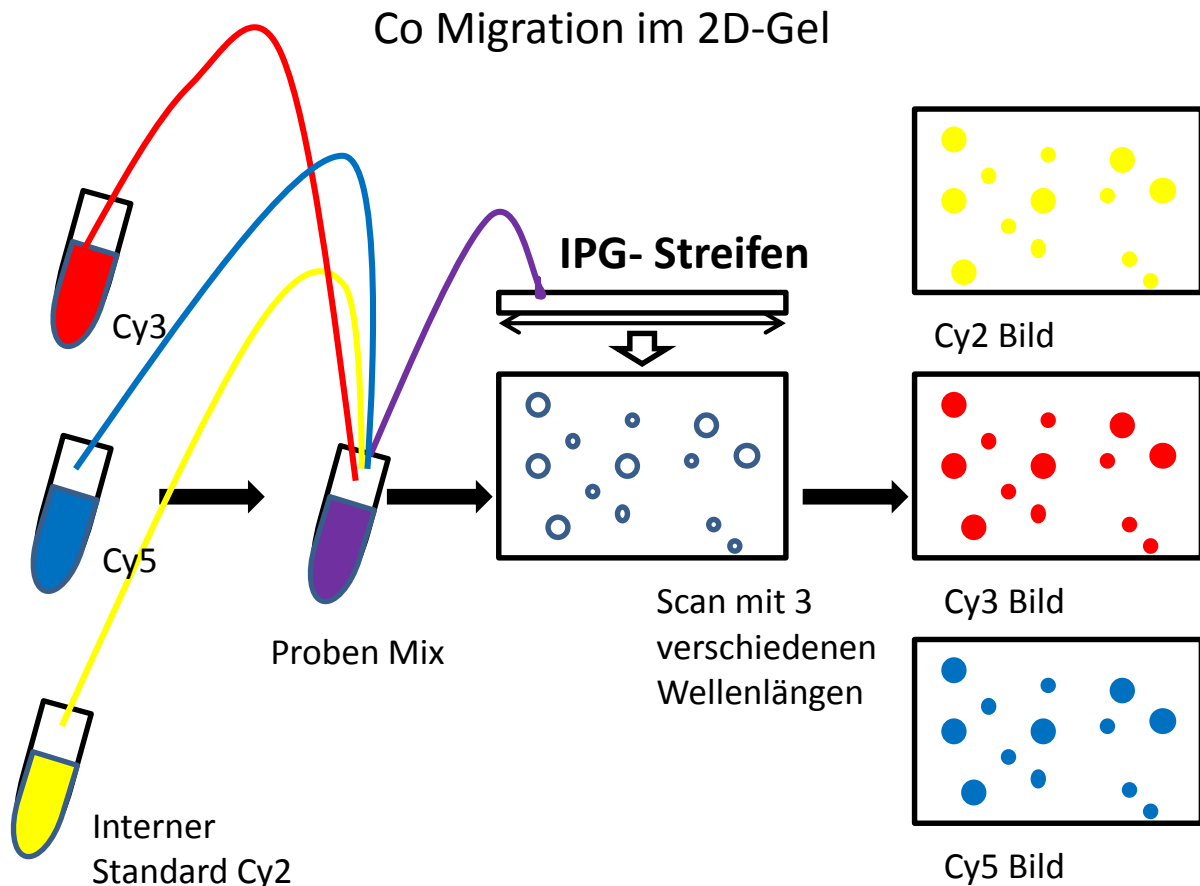


Abbildung 6.2: Arbeitsablauf bei 2D-DIGE. Die markierten Proben werden vereint und in der ersten Dimension über einen nichtlinearen pH-Bereich 3-10 aufgetrennt. Die Auftrennung nach Größe erfolgt in der 2. Dimension. Anschließend werden die Gele mit 3 verschiedenen Wellenlängen gescannt, wobei 3 Bilder generiert werden, die zur Analyse verwendet werden.

Aus den lyophilisierten Cyaninfarbstoffen wurde für das *minimal dye* nach Herstellerangaben (GE Healthcare) eine Stammlösung hergestellt (bei -80 °C 5-6 Wochen stabil). Für die Markierung wurde eine 400 pmol Lösung immer frisch hergestellt (*minimal labelling*). 50 µg Protein der zu markierenden Probe wurde in einem Volumen von 30 µl Lysepuffer DIGE markiert und jeweils 3 Reaktionsgefäße/Probe vorbereitet. Jede Probe wurde einmal mit jeder der 3 Farben (Cy2, Cy3, Cy5) markiert. Zu jeder einzelnen Probe wurde 1 µl Cyaninfarbstoff gegeben, auf Eis und im Dunkeln inkubiert und die Reaktion nach 30 min mit 1 µl L-Lysin-Lösung gestoppt. Beim sog. *minimal labelling* werden 3 *CyDye DIGE Fluor minimal dyes* (GE Healthcare) eingesetzt: CyTM2, Cy3 und Cy5. Die Farbstoffe sind hoch sensitiv und es ist möglich bis hinab zu 25 pg eines einzelnen Proteins zu markieren. Die Markierung ist über einen Bereich von 10^5 linear zur Proteinkonzentration. Die Fluoreszenzfarbstoffe besitzen eine reaktive NHS Ester Gruppe die eine kovalente Bindung mit der ε-Aminogruppe der Lysin-Reste der Proteine eingeht (Abb. 6.3). Durch Bindung der Farbstoffe ist die Änderung des isoelektrischen Punktes der Proteine nicht signifikant,

da der Verlust der intrinsischen, einfach positiven Ladung des Lysin-Rests der Proteine bei neutralem und saurem pH-Wert durch die (+1)-Ladung der Farbstoffe kompensiert wird. Abhängig vom eingesetzten Farbstoff ändert sich die Masse der Proteine um ~435-466 Da/ markierten Lysin-Rest (Tabelle 6.1).

Tabelle 6.1: Zusätzliche Molekulare Masse, die nach der Markierung mit CyDyes an das Protein gekoppelt ist.

Zusätzliches Molekulargewicht der Fluoreszenzfarbstoffe (Da)	
CyDye DIGE fluor Cy2 minimal dye	435,52
CyDye DIGE fluor Cy3 minimal dye	467,69
CyDye DIGE fluor Cy5 minimal dye	465,67

Da der Großteil der Proteine nicht markiert ist, ist es notwendig die Gele vor dem Ausstechen der Spots nachzufärben, da andernfalls durch das Plus an Masse nur geringe Proteinmengen ausgestochen werden, die für die folgende massenspektrometrische Analyse nicht ausreichend sind (Shaw et al. 2003). Durch den Zugewinn an Masse ist darüber hinaus die Markierung von mehr als einem Lysin-Rest zu vermeiden. Wird mehr als ein Rest markiert, zeigt sich das im 2D-Gel durch multiple Spots auf der vertikalen Achse. Beim *minimal labelling* werden 50 µg Protein/Reaktion markiert. Bei dieser Reaktion ist der Anteil der eingesetzten Farbstoffe der limitierende Faktor und die Markierungsreaktion endet, wenn jedes markierte Protein nur eine Markierung trägt und als ein Spot sichtbar ist (nur 1-2 % der Lysin-Reste/Protein werden markiert) (Ettan DIGE System User Manual 18-1173-17 Edition AB, S. 15 f.)

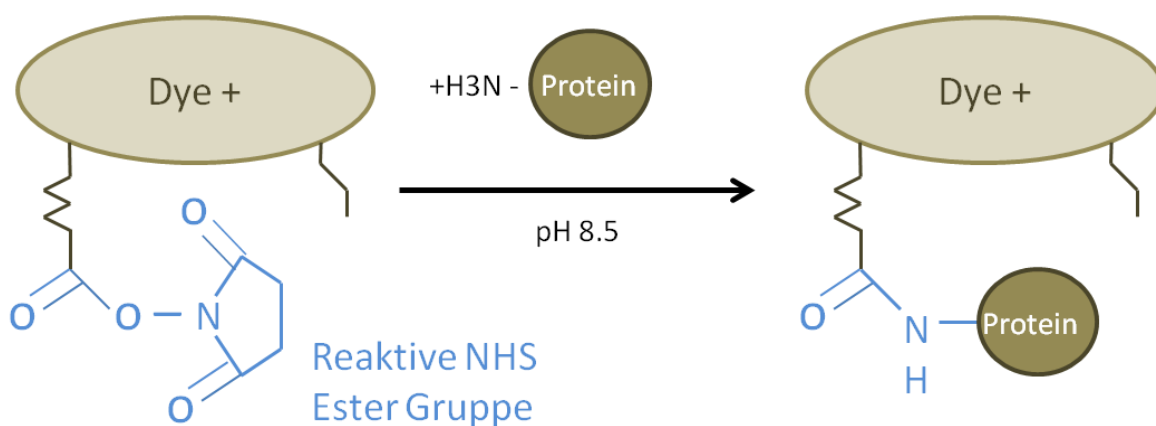


Abbildung 6.3: Reaktionsschema der Markierungsreaktion. Die reaktive NHS Ester Gruppe der CyDyes bindet über eine Amidbindung kovalent an den Lysin-Rest eines Proteins (nach Ettan DIGE System User Manual 18-1173-17 Edition AB, S. 16).

6.5.1.5 Beladung der DIGE-Gele

Es wird ein interner Standard verwendet, in dem jede zu untersuchende Probe zu gleichen Teilen enthalten ist. Für den internen Standard wurden die Cy2 markierten Proben verwendet. Dafür wurden von jeder einzelnen Zelllinie die 4 Cy2 markierten Proben (Kontrolle und 3 Zeitpunkte nach Bestrahlung) vereint. Jede einzelne Probe wurde, sowohl Cy3, als auch Cy5 markiert, um ein technisches Replikat zu erhalten. Für die biologischen Replikate wurde nach dem gleichen Prinzip vorgegangen. Die Proben wurden nun so auf die Gele verteilt, dass kein Gel die gleiche Beladung aufwies (Abb. 6.4).

Gel	Cy2	Cy3	Cy5
1	Vereinter interner Standard Linie 1	Kontrolle Linie 1	24 h post-IR Linie 1
2	Vereinter interner Standard Linie 1	4 h post-IR Linie 1	0,5 h post-IR Linie 1
3	Vereinter interner Standard Linie 1	0,5 h post-IR Linie 1 biologisches Replikat	Kontrolle Linie 1 biologisches Replikat
4	Vereinter interner Standard Linie 1	24 h post-IR Linie 1 biologisches Replikat	4 h post-IR Linie 1 biologisches Replikat

Abbildung 6.4: Schema zur Beladung der DIGE-Gele. Im internen Standard sind alle acht zu vergleichenden Proben zu gleichen Teilen enthalten. Dieses Schema wurde für jede der fünf untersuchten Zelllinien verwendet. Es wurde jeweils ein zweites Gel-Set angefertigt, bei dem alle Proben reziprok markiert wurden (technisches Replikat).

4.5.1.6 Erste Dimension -Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Bei der Separierung der Proteine über den isoelektrischen Punkt wandern die Proteine durch das Anlegen eines elektrischen Feldes über einen pH-Gradienten bis zu ihrem isoelektrischen Punkt, an dem sie ungeladen sind. Hierfür wurden 17 cm lange, fertige Gelstreifen (IPG-Streifen) mit einem immobilisierten, nicht linearem pH-Gradienten (pH 3-10) (BioRad) verwendet. Durch den großen pH-Bereich wird die Mehrzahl der Proteine in einem einzigen Gel separiert. Die Rehydratisierung der Gelstreifen wurde passiv bei RT für 7 h durchgeführt. Hierfür wurden die Streifen mit der Gelseite nach unten luftblasenfrei auf 330 µl Rehydrationspuffer platziert und mit je 1,5 ml Glycin überschichtet, um ein Austrocknen zu verhindern. Die markierten Proben wurden mit einer Gesamtkonzentration von 150 µg (50 µg jeder Farbe / Gel) nach o.g. Schema vereint. Zu jeder Probe wurde 1 µl Pharmalyte und 5 µl DTT Stammlösung (40 mg DTT + 75ml Lysepuffer DIGE) gegeben. Das Volumen von 96 µl wurde mit 4 µl Lysepuffer DIGE auf 100 µl aufgefüllt. Die Fokussierung erfolgte über *Cuploading* von der Anode zur Kathode. Nach der IEF wurden die Streifen bei -20 °C eingefroren.

Tabelle 6.2: Fokussierungsbedingungen der IPG-Streifen mit 17 cm Länge

Schritt	Voltstärke (V)	Gradient	Zeit (h)	Voltstunden	Funktion
1	250	Rapid	1	250	Proteineintritt
2	2500	Rapid	1	500	Proteineintritt
3	31000	Linear	2	2000	Fokussierung
4	48000	Rapid	6	48000	Fokussierung
5	100	Rapid	∞	1400	Step and Hold

6.5.1.7 Zweite Dimension SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

24 h vor der SDS-PAGE wurden mit Hilfe des EttanDALTtwelve (GE Healthcare) Gießstands 12,5 % SDS-Gele gegossen. Zur Äquilibration der Streifen wurde das Glycin vorsichtig mit Zellstoff entfernt und die Streifen zuerst 15 min mit DTT-Lösung auf einer Wippe inkubiert, um die Disulfidbrücken zu zerstören. Anschließend wurde die Lösung abgekippt und weitere 15 min mit Jodacetamid-Lösung äquilibriert. Dies verhinderte die erneute Oxidierung der Sulfidbrücken durch Alkylierung der Hydrogensulfatgruppen. Für die SDS-PAGE wurden die IPG-Streifen kurz in Elektrophoresepuffer getaucht und sofort auf die Gelkante gesetzt und ein, mit 10 µl Längenstandard getränktes Stück Filterpapier, neben dem Ende des IPG-Streifens platziert. Die

IPG-Streifen wurden mit 0,7 % Agarose fixiert und die Gele in die Elektrophoresekammer eingespannt. Der Probeneinlauf erfolgte 2 h bei 60 mA/100 Vh. Die Separation erfolgte 15-16 h bei 210 mA/1300-1400 Vh.

6.5.1.8 Visualisierung von Proteinen

Die Gele blieben für die Bildaufnahme in den zuvor gut gereinigten Glasplatten. Die Gele wurden mit dem Typhoon Trio™ mit den Einstellungen aus Tabelle 6.3 gescannt. Die Einstellung wurde so gewählt, dass sich die intensivsten Spots nicht in der Sättigung befanden und der Unterschied zwischen den Farbstoffen, bzw. Gelen nicht zu groß war. Mit Hilfe der Software ImageQuant™ wurde die Sättigung der Spots überprüft und die Scan Einstellungen angepasst. Es war zu beachten, dass die Einstellungen für ein zu vergleichendes Set identisch waren. Die Bilder wurden für die Auswertung im Gel-Format gespeichert. Nach dem Scan wurden die Bilder mit der Bildanalyse Software Decyder 6.0™ ausgewertet.

Tabelle 6.3: Scan Einstellungen

Farbstoff	Voltzahl	microns
Cy3	530	100
Cy5	490	100
Cy2	490	100

6.5.1.9 Auswertung

Die Detektion der Spots erfolgte im DIA-Modul (Differentielle In-Gel Analyse). Der Parameter *Estimated number of Spots* wurde auf 10.000 eingestellt. Nach der Detektion der Spots wurden die korrespondierenden DIA-Dateien in ein BVA-Modul (Biologische Varianz Analyse) importiert und ausgewertet. Bei der BVA Auswertung wurden die Gelbilder den passenden Zelllinien zugeordnet und die jeweiligen 2 Replikate miteinander verglichen, wobei die Proteinexpression zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung gegen die unbestrahlte Kontrolle verglichen wurde. Die Proteinmuster der zu vergleichenden Gele wurden einander angepasst und alle Spots manuell überprüft, um Artefakte (Staub, etc.) aus der Analyse auszuschließen und eine Fehlanpassung der Muster zu vermeiden. Das Programm DeCyder™ errechnete anschließend automatisch die Regulationen mit Signifikanzen. Spots mit einem p-Wert $\leq 0,05$ (1-ANOVA) und

einem Regulationsfaktor $\geq \pm 1,1$ wurden für die spätere Identifizierung mit einem Pickstatus versehen.

6.5.1.10 Fixieren und Färben der Gele

Nach dem Scannen werden die Gele vorsichtig von der Glasplatte entfernt und für 3-5 h in Fixierlösung getränkt. Dies verhindert die Diffusion der Proteine im Gel nach dem Entfernen des elektrischen Feldes. Nach der Fixierung wurden die Gele zuerst ÜN mit 1x Flamingo Fluorescent Dye (*BioRad*), danach ÜN mit Coomassie Brilliant Blue (*BioRad*) gefärbt. Anschließend wurden die Gele 2-4 h mit dest. H₂O wieder entfärbt. Die Aufbewahrung der Gele erfolgte in verschließbaren Plastikboxen bei 4 °C in dest. H₂O.

6.5.2 Probenvorbereitung für massenspektrometrische Analyse MALDI-TOF/MS

Die zu identifizierenden Spots wurden mit einer Pipettenspitze ausgestanzt, in ein 1 ml Reaktionsgefäß gegeben und bis zur Analyse in 200 µl dest. H₂O bei 4 °C gelagert.

24 h vor der MALDI-TOF/MS Analyse erfolgte der tryptische Verdau der Proteine. Die Spots wurden mit 15 mM K₃Fe(CN)₆ und 50 mM Na₂S₂O₃ in mehreren Schritten entfärbt. Anschließend wurden die Gelstücke für 15 min in einem Waschpuffer (50 mM NH₄HCO₃ in 30 % Acetonitril (ACN)) gewaschen. Nach einem Äquilibrierungsschritt in 10 mM in NH₄HCO₃ wurden die Gelstücke 2 x mit 10 mM NH₄HCO₃ rehydriert. Die Proben wurden mit 0,1 ng modifizierten Trypsin (SIGMA, 10 ng/µl in 50 mM NH₄HCO₃) über Nacht bei 37 °C verdaut. Der Überstand wurde gesammelt und mit den Eluat der anschließenden Elutionsschritte (80 % v / v ACN, 1% v / v Trifluoressigsäure (TFA)) vereinigt. Die vereinigten Eluate wurden in einer SpeedVac Zentrifuge getrocknet. Die getrockneten Proben wurden in 20 µl 50 % v/v ACN, 0,1 % v/v TFA für die nachfolgende MALDI-TOF/MS Analyse resuspendiert.

6.5.2.1 Proteinidentifizierung der 2D-Spots durch Massenspektrometrie (MALDI-TOF/MS)

Zur Identifizierung der Spots wurde die Matrix gestützte Laserdesorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie MALDI-TOF/MS genutzt (Marcus et al. 2000). Eine der heutzutage wichtigsten Mechanismen zur Ionisierung von Analyten und deren Überführung in den Massenanalysator ist die *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI) (Karas and Hillenkamp 1988) (Abb.: 6.5). Für die MALDI-TOF/MS Analyse werden die enzymatisch verdauten Proteine mit einer UV-Strahlung absorbierenden Matrix (meist bestehend aus niedermolekularen aromatischen Säuren) auf einen leitfähigen Träger getropft. Durch Laserbeschuss wird die Matrix in die Gasphase sublimiert und die Analytmoleküle werden dabei mitgerissen. Die gebildeten Ionen sind zum Großteil einfach positiv geladen. Ihre Beschleunigung erfolgt über ein elektrisches Potential, durch das die Ionen in den Massenanalysator gelangen. MALDI Massenspektrometer sind häufig an sog. *time of flight* (TOF) Massenanalysatoren gekoppelt, wodurch Ionen geringer Massendifferenz einzeln detektiert werden können.

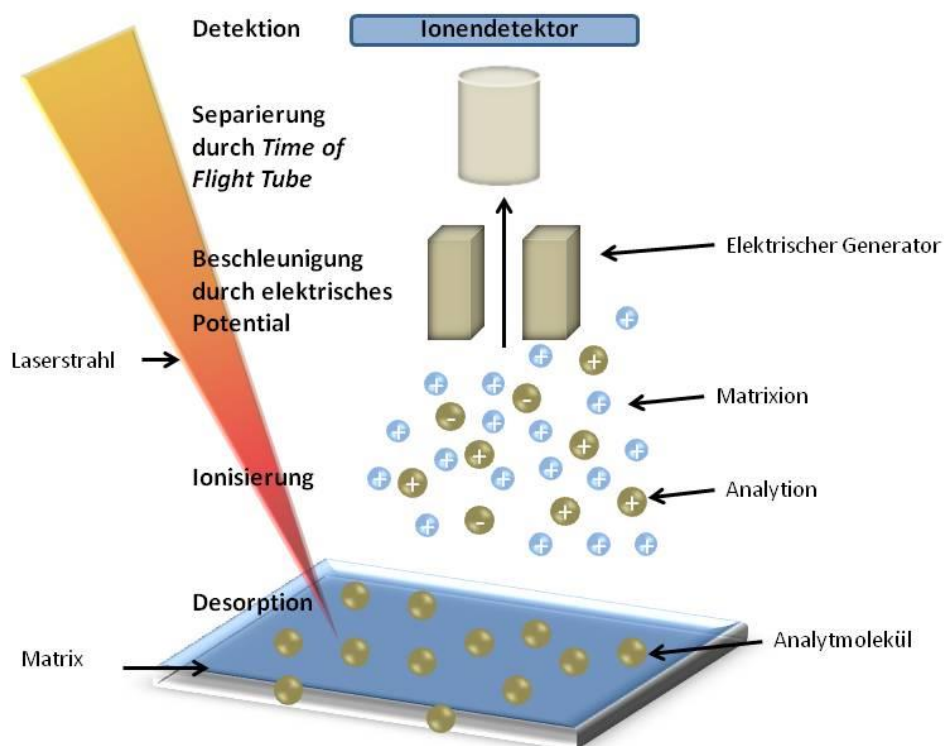


Abbildung 6.5: Schematischer Aufbau der MALDI-TOF. Bei dem Prozess der MALDI erfolgt die Sublimierung der Matrix- und Analytmoleküle in die Gasphase über UV-Laser-Strahlung. Die Analytionen werden teilweise durch Photoionisierung gebildet. In der Gasphase erfolgt die Protonierung der Analyte durch Molekülinteraktionen. Die Ionen werden über ein elektrisches Potential in den Massenanalysator beschleunigt (modifiziert nach Karas *et al.* 2000).

Die Analyse im MALDI-Massenspektrometer erfolgte durch Co-Kristallisierung der Peptidgemische mit einer Trägermatrix auf einem Probenträger. Hierfür wurden 0,5 µl der Probe auf einen Edelstahl-MALDI-Probenträger getropft und komplett trocknen gelassen. Anschließend wurden 0,5 µl einer Matrix-Lösung bestehend aus 5 mg/ml α -Cyano-4-Hydroxymizinsäure (CHCA, Bunker, Bremen, Deutschland) auf die getrockneten Proben gegeben. Die Messung erfolgte mit einem Proteomics Analyzer 4700 Massenspektrometer (MALDI-TOF/TOF) (Applied Biosystems, Framingham, USA). Die Daten wurden im Positiv-Reflektor-Modus mit einem 355 nm Nb:YAG-Laser bei einer Ionen-Beschleunigungs-Spannung von 20 kV gemessen.

Der Massenbereich (*mass range* = m/z 900-4000) wurde mit dem Peptid Kalibrierstandard III (Applied Biosystems) kalibriert. Für jedes MS- und MS/MS-Spektrum wurden 3000 Laserschüsse akkumuliert. In Abhängigkeit der Daten wurden die 8 häufigsten Ionen (ohne die Massen von autolytischen Produkten von Trypsin und bekannten Keratin Peptid-Massen) für weitere MS / MS-Analysen ausgewählt.

6.5.3 Datenbankabgleich

Die erworbenen MS/MS-Spektren wurden mit der Protein Pilot Software 3.0 analysiert. Die Datenbanksuche erfolgte mit Mascot Wizzard (Version 2.3.02) auf der Basis der humanen Datenbank Ensembl human und SwissProt. Die Identifizierung erfolgte in der Proteomics Core Facility des Helmholtz Zentrum München (Sarioglu et al. 2006). Mascot übernimmt makrogesteuert die Vorverarbeitung der akquirierten Spektren. Es wird hier auf die Programmbibliotheken des Mascot Distillers zurückgegriffen, um aus den Rohspektren die Peaklisten der einzelnen Messungen zu generieren. Im Zentrum der Peakdetektion und Anisotrophierung steht die Anpassung der experimentellen Elementarverteilung mit der idealen errechneten Verteilung. Diese Idealverteilung ist vorherberechnet für das Peptid oder die Aminosäuresequenz bei genau dem gemessenen m/z-Wert. Das Profil der Idealverteilung wird im nachfolgenden Schritt durch die Annäherung der Masse, Auflösung, Intensität und Ladungszahl angepasst. Im Fall einer qualitativ guten Anpassung wird der Wert zur Peakliste hinzugefügt und weitere Peaks angepasst (Berndt et al. 1999).

Anschließend werden die experimentell bestimmten Massen der Peptide mit den errechneten Massen der Datenbank Wert für Wert abgeglichen. Jedes Peptid, das zu einem Protein mit einer angegebenen Massentoleranz zugeordnet werden kann, wird gezählt, wobei jedes theoretisch errechnete Peptid eine empirische Gewichtung erhält. Diese Gewichtung hängt von dem relativen Vorkommen des Peptids ab und wird maßgeblich durch seine Zusammensetzung bestimmt. Selten vorkommende Aminosäuren (Prolin, Cystein bei Prokaryoten), oder spezielle, für ein Protein hochspezifische Domänen, beeinflussen somit den MOWSE-Score besonders signifikant (Pappin et al. 1993). Neben der Gewichtung der Peptide geht auch die Massentoleranz in die Berechnung mit ein. Hohe Massentoleranzen wirken sich negativ auf den Score aus. Eine Proteinidentifizierung gilt als signifikant, wenn der MOWSE-Score die Signifikanzgrenze von > 63 mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p=0,05$ unterschreitet. Abbildung 6.6 zeigt das Ergebnis einer Mascot-Analyse für das Protein MCM7.

Match to: ENSP00000307288**Score:** 67**Expect:** 0.015

MCM7 | HGNC (curated) | DNA replication licensing factor MCM7 (CDC47 homolog)(P1.1-MCM3)
 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P33993] | 7 | ENSG00000166508 | ENST00000303887

Nominal mass (Mr): 81884; Calculated pI value: 6.08

NCBI BLAST search of ENSP00000307288 against nr

Unformatted sequence string for pasting into other applications

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: 20%

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MALKDYALEK EKVKKFLQEF YQDDELGKKQ FKYGNQLVRL AHREQVALYV
 51 DLDDVAEDDP ELVDSICENA RRYAKLFADA VQELLQYKE REVVNKDVLD
 101 VYIEHRLMME QRSRDPGMVR **SPQNQYPAEL MRR**FELYFQG PSSNKPRVIR
 151 EVRADSVGKL VTVRGIVTRV SEVKPKMVVA TYTCDQCGAE TYQPIQSPTF
 201 MPLIMCPSQE CQTNR**SGGRL YLQTR**GSRFI KFQEMKM**QEH SDQVPVGNIP**
 251 **RSITVLVEGE NTR**IAQPGDH VSVTGIFLPI LRTGFRQVVQ GLLSETYLEA
 301 HRIVK**MNKSE DDESGAGELT REELR**QIAEE DFYEKLAASI APEIYGHEDV
 351 KKALLLLL VG GVDQSPRGMK IRGNINICLM GDPGVAK**SQL LSYIDR**LAPR
 401 SQYTTGRGSS GVGLTAAVLR DSVSGELTLE GGALVLADQG VCCIDEFDKM
 451 AEADRTAIHE VMEQQTISIA K**AGILTTLNA RCS**ILAAANP AYGRYNPRRS
 501 LEQNIQLPAA LLSRFDLLWL IQDRPDND LRLAQ**HITYV HQHSRQPPSQ**
 551 **FEPLDMK**LMR RYIAMCREKQ PMVPESLADY ITAAYVEMRR EAWASKDATY
 601 TSARTLLAIL RLSTALARLR **MVDVVEKEDV** NEAIRLMEMS KDSLLGDKGQ
 651 TART**QRPADV IFATV**RELVS GGR**SVRFSEA EQRC**VSRGFT PAQFQAALDE
 701 YEELNVWQVN ASRTRITFV

Residue Number Increasing Mass Decreasing Mass

Start -End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss Sequence
121 -132	1449.6742	1448.6669	1448.6718	-3	0 R.SPQNQYPAELMR.R Oxidation (M)
(No match)					
121 -132	1449.6742	1448.6669	1448.6718	-3	0 R.SPQNQYPAELMR.R Oxidation (M)
(No match)					
121 -133	1605.7742	1604.7669	1604.7729	-4	1 R.SPQNQYPAELMRR.F Oxidation (M)
(No match)					
216 -225	1150.6461	1149.6388	1149.6254	12	1 R.SGGRLYLQTR.G (No match)
237 -251	1722.8110	1721.8037	1721.8155	-7	0 K.MQEHSQVPVGNIPR.S Oxidation
(M) (No match)					
252 -263	1317.7019	1316.6946	1316.6936	1	0 R.SITVLVEGENTR.I (No match)
252 -263	1317.7019	1316.6946	1316.6936	1	0 R.SITVLVEGENTR.I (Ions score 3)
306 -321	1738.8032	1737.7959	1737.7475	28	1 K.MNKSEDESAGELTR.E (No match)

309 -325	1892.8435	1891.8362	1891.8395	-2	1	K.SEDDESGAGELTREELR.Q (No match)
326 -335	1271.5814	1270.5741	1270.5717	2	0	R.QIAEEDFYEK.L (No match)
388 -396	1094.5861	1093.5788	1093.5768	2	0	K.SQLLSYIDR.L (No match)
472 -481	1029.5746	1028.5673	1028.5978	-30	0	K.AGILTTLNAR.C (No match)
546 -557	1432.6650	1431.6577	1431.6704	-9	0	R.QPPSQFEPLDMK.L Oxidation (M) (No match)
621 -635	1761.8582	1760.8509	1760.8615	-6	1	R.MVDVVEKEDVNEAIR.L Oxidation (M) (No match)
654 -666	1473.8173	1472.8100	1472.8100	0	0	R.TQRPADVIFATVR.E (No match)
654 -666	1473.8173	1472.8100	1472.8100	0	0	R.TQRPADVIFATVR.E (No match)
674 -683	1208.6134	1207.6061	1207.5945	10	1	R.SVRFSEAEQR.C (No match)
674 -683	1208.6134	1207.6061	1207.5945	10	1	R.SVRFSEAEQR.C (No match)

Abbildung 6.6: Auflistung der Massen, die im Rahmen der Mascot-Analyse mit der Proteindatenbank Ensembl human abgeglichen werden konnten. Die Tabelle enthält neben der gemessenen Masse *Observed*, die berechnete Masse *Mr(Calc)*, die Masseabweichung *Delta*, die nicht verdauten Trypsinschnittstellen *Miss* und die Peptidsequenz im Einbuchstabencode.

6.5.3.1 Analyse mittels Proteindatenbanken

Um die biologische Funktion der identifizierten Proteine (Kandidatenproteine) zu ermitteln, wurde die SwissProt Datenbank verwendet. Um den Bezug der Proteine zu ionisierender Strahlung herzustellen, wurde in der (bio)medizinischen Datenbank Pubmed mit entsprechenden Verknüpfungen der Schlagworte nach thematisch passenden Publikationen recherchiert, welche sich mit den Kandidatenproteinen im Zusammenhang mit Bestrahlung und Stressantwort beschäftigten. Um eine Netzwerkanalyse der Kandidaten durchzuführen, wurde das Internet-basierte Analyseprogramm Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity® Systems, Redwood City, California, USA; www.ingenuity.com) verwendet. Die Netzwerke werden basierend auf Veröffentlichungen generiert. Für die Analyse werden die Regulationsfaktoren der Kandidatenproteine, sowie deren SwissProt Zugangsnummern über ein Excel-Datenblatt in das Programm geladen. Diese Zugangsnummern werden von der IPA-Applikation erkannt und anschließend, basierend auf Informationen aus der Ingenuity Signalweg Informationsbank (Ingenuity Pathways Knowledge Base), in ein globales molekulares Netzwerk übertragen. Der exakte Fischer-Test wurde zur Abschätzung der Signifikanz der gefundenen Netzwerke verwendet. Die Punktzahl jedes Netzwerks gibt einen numerischen Wert an, der dessen Relevanz und die Größe des Netzwerks, basierend auf der Anzahl an Proteinen im Datensatz angibt.

6.5.4 Western Blot

6.5.4.1 Verwendete Zelllinien

DIGE- Lysepuffer		RIPA- Lysepuffer	
Zelllinie	Strahlenempfindlichkeit	Zelllinie	Strahlenempfindlichkeit
Kontrollen		LUCY	
GM03323(+)	Normal	4008	Sensitiv
GM03189(-)	Sensitiv	4039	Sensitiv
HuKo	Normal	4040	Sensitiv
LUCY		4064	Normal
20037	Normal	20038	Sensitiv
4060	Sensitiv	36011	Normal

Die Validierung der Expressionsänderung der Kandidatenproteine nach Bestrahlung erfolgte mittels Western Blot.

6.5.4.2 Herstellung von Gesamtproteinextrakten für die 1D-Gelelektrophorese

Die pelletierten Zellen (1×10^7 Zellen) wurden aufgetaut und mit 200 µl RIPA Puffer versetzt und gut resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend für 15 min bei 4 °C und 1000 rpm geschüttelt und 4 x 3 sec auf Eis sonifiziert, um die Zellen vollständig zu lysieren. Das Zelldebris wurde durch Zentrifugation 20 min bei 20000 x g vom Proteingemisch getrennt. Der Überstand mit den gelösten Proteinen wurde abgenommen, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

6.5.4.3 Proteinmengenbestimmung der 1D-Gesamtproteinextrakte nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der RIPA-lysierten Proben erfolgte photometrisch nach der von Bradford beschriebenen Methode (Bradford 1976). Das Verfahren basiert auf der Komplexbildung zwischen dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G und den gelösten Proteinen. Der Komplex aus Protein und Farbstoff verursacht eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 zu 595 nm. Die Absorptionsmenge ist proportional zum vorhandenen Protein. Der lineare Konzentrationsbereich beträgt 0.1-1.4 mg/ml Protein wenn BSA als Standard-Protein eingesetzt wird. Vor Beginn der Messung wurde eine Standardkurve mit BSA erstellt, wobei aus einer 14,5 µg/ml BSA-Stammlösung eine Verdünnungsreihe mit 0 µg, 2 µg, 4 µg, 8 µg, 10 µg und 12 µg BSA in je 1 ml dest. H₂O hergestellt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 10 min im Dunkeln wurde die Absorption im Photometer bei 595 nm gemessen. Anhand der Standardkurve konnte auf die Proteinkonzentration der zu bestimmenden Proben rückgeschlossen werden.

6.5.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen (Laemmli, 1970)

Bei der denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Für das Polyacrylamidgel wird ein Netzwerk aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid generiert. Für die Größentrennung der Proteine wurden fertige Gele verwendet, mit denen die Trennung aller Proteingrößen möglich ist (Criterion SFX, any kd, 18 W, BioRad). Die Gesamtproteinextrakte wurden mit 3 x Laemmli Puffer auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt und 10 µg Protein/Probe auf das Gel aufgetragen. Der Probeneinlauf erfolgte 30 min bei 20 mA/Gel und die Separierung der Proteine nach Größe 50 min bei 40 mA/Gel.

6.5.4.5 Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Membranen (ElektroBlot)

Diese Methode dient dem Transfer der zuvor durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Membran (Towbin et al. 2001). Die Banden wandern im elektrischen Feld (1 mA/cm²), das senkrecht zum Gel angelegt wird auf die Membran, die sich zwischen Gel und Anode befindet. Es wurden Nitrozellulose-oder PVDF-Membranen benutzt, wobei die PVDF-Membranen vor dem

Blotten mit 100 % Methanol aktiviert wurden und kurz in dest. H₂O gewaschen. Sowohl PVDF, als auch die Nitrozellulose Membranen wurden vor der Nutzung in Blot-Puffer equilibriert.

6.5.4.5.1 *TankBlotting*

Vor dem Aufbau des Blots, wurden je Gel zwei dünne Filterpapiere und zwei Blotfleece in Blotpuffer eingeweicht. Die Gele wurden vorsichtig aus der Kassette entfernt und Luftblasen zwischen Membran und Gel wurden sorgfältig ausgerollt. Da die Temperatur bei dieser Methode aufgrund der Puffermenge (höhere Salzkonzentration) und der daraus resultierenden höheren Spannung steigt, werden während des Blottens Kühlakkus verwendet, die zuvor bei -20 °C gelagert wurden. Die Blotkammer wurde mit 4 °C kaltem Blotpuffer aufgefüllt. Die Übertragung der Proteine erfolgte 90 min bei 400 mA (konstant). Die Temperatur wurde zwischenzeitlich überprüft.

6.5.4.5.2 *Semi-Dry Blotting*

Vor dem Blotten wurden die Gele vorsichtig aus der Kassette entfernt und 10 min in Blotpuffer auf einem Wippschüttler equilibriert. Dies wurde ebenfalls mit der Membran und 2 dicken Blotfiltern pro Gel durchgeführt. Nach der Equilibrierung wurde der Blot zusammengebaut und der Proteintransfer erfolgte 90 min bei 15 V (konstant).

6.5.4.5.3 *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (BioRad)*

Bei diesem System wurden fertige Transferpakete verwendet, die eine zugeschnittene Membran (Nitrozellulose oder PVDF) und Filterpapiere enthalten, die in einem speziellen Puffersystem getränkt sind. Die Methode entspricht dem Semi Dry System, der Transfer ist jedoch durch eine sehr hohe Transfereffizienz bereits nach 7 min abgeschlossen.

6.5.4.6 Entwicklung der Blot-Membran mit BCIP/NBT (Alkalische Phosphatase Kit)

Nach dem Transfer wurde die Membran mit 25 ml Blockierlösung in eine Inkubationsflasche überführt und bei RT ÜN auf einem Rollenmischer geblockt. Anschließend wurde die Membran 3 x 10 min mit 1 x TBS-Lösung gewaschen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte 3-4 h bei RT in TBS-T/5 % BSA. Nach der Inkubation erfolgten 3 Waschschrte (10 min) mit 1 x TBS-T, gefolgt von 1 h Inkubation mit dem AP-konjugierten, sekundären Antikörper in TBS-T / 5 % BSA. Im Anschluss wurde die Membran nochmals 3 x 10 min mit TBS-T gewaschen. Die Signalentwicklung erfolgte nach Herstellerangaben und sollte 10 min nicht überschreiten. Die Zeit bis zur Signalentwicklung wurde notiert, die Membran weitere 10 min mit dest. H₂O gespült, beschriftet und anschließend ÜN zwischen zwei Filterpapieren getrocknet.

6.5.4.7 Fixieren und Färben der Gele

Zum Fixieren wurden die Gele 0,5 h in Fixierlösung (30 % ETOH, 10 % Essigsäure) auf einem Wippschüttler inkubiert. Das Färben erfolgte lichtgeschützt für 3 h, oder ÜN mit Flamingo Fluorescent Dye (BioRad). Das Entfärben der Gele erfolgte 10 min in dest. H₂O. Anschließend wurden die Gele gescannt und 1 h mit Coomassie Brilliant Blue nachgefärbt.

6.5.4.8 Digitalisieren der Gele und Blot-Membranen

Für die Bildakquise wurde die Software Quantity One® verwendet. Die Gele wurden mit dem FX-Scanner aufgenommen. Für die Fluoreszenzfärbung wurde der Filter *Cypro Ruby* verwendet. Die Coomassie gefärbten Gele und die Membranen wurden mit dem GS-800 digitalisiert. Für die Gele wurde die Filtereinstellung Coomassie gewählt, die Membranen wurden mit dem BCIP/NBT Filter visualisiert. Alle Bilder wurden mit der höchsten Auflösung digitalisiert und sowohl als .scn -Datei gespeichert, als auch als .jpeg-Datei exportiert.

6.5.4.9 Entwicklung der Blot-Membran mit der Stain-Free (SF) Methode (BioRad)

Bei dieser Methode wurden neuartige, fertige Gele (TGX (*Tris Glycine eXtended*) any kD Criterion SF 1-D SDS, 18 slots) der Firma BioRad für die SDS-PAGE verwendet. Diese Gele beinhalten Trihalo Verbindungen, die durch eine UV induzierbare Reaktion mit Tryptophanresten der aufgetrennten Proteine Fluoreszenzsignale generieren, die in den Gelen und nach dem Blotten auf der Membran detektiert werden können. Die Membranen wurden bei RT ÜN geblockt und anschließend der primäre Antikörper in 1 x TBS-T/5 % BSA 3 h bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran 4 x 10 min mit 1 x TBS-T gewaschen und danach mit dem sekundären HRP-konjugierten anti-Maus Antikörper in 1 x TBS-T/5 % Milchpulver 1 h bei RT inkubiert. Nach 4 weiteren Waschschritten wurde die Membran 3 min mit dem Immun-Star WesternC Goat Anti-Mouse (GAM)-HRP Detection Kit behandelt und das Chemilumineszenzsignal mit dem Kamerasystem ChemiDoc MP aufgenommen.

6.5.4.10 Digitalisieren der SF Gele

Für die Bildakquise der 1D-Gele und der zugehörigen Fluoreszenzblots wurde das GelDoc EZ Imaging System von BioRad verwendet. Für die Aufnahme der durch Chemilumineszenz generierten Blotsignale, wurde das Kamerasystem ChemiDoc genutzt.

6.5.4.11 Auswertung

Um Western Blot Signale innerhalb eines und zwischen mehreren Gelen vergleichen zu können, müssen die Signale normalisiert werden. Hierfür wird normalerweise die Intensität des immunchemischen Signals eines house keeping Proteins als Referenz verwendet. In diesen Analysen wurden Aktin, Gapdh und Tubulin als Referenzsignal verwendet.

6.5.4.11.1 Auswertung mit einer Ladekontrolle

Die Auswertung erfolgte mit der Software Quantity One. Die Membranen wurden im Farbkanal Silber ausgewertet. Die Signalintensitäten wurden nach Subtraktion des Hintergrundsignals mit dem Volumen Werkzeug gemessen. Um die Signalintensität des Zielproteins zu bestimmen, wurde folgende Rechnung verwendet:

$$\text{relatives Signal} = \text{Signalintensität des Zielproteins} / \text{Signalintensität der Referenz}$$

6.5.4.11.2 Auswertung mit der SF Methode (BioRad)

Die Auswertung der Gele und Blots erfolgte mit der Software ImageLab (BioRad) über die Bestimmung des Gesamtfluoreszenzsignals pro Spur (das Hintergrundsignal wurde zuvor subtrahiert). Die Signalintensitäten der Banden (Gapdh, RAD50) wurden mit dem Volumen-Werkzeug der Software bestimmt. Die Signale des RAD50 Antikörpers (Zielprotein) wurden, wie unter 6.5.4.11.1 genannt, zum einen mit dem Gapdh-Signal normalisiert und zum anderen mit der Stain-Free Methode ausgewertet. Bei der letztgenannten Methode wird das Signal des Zielproteins mit der Gesamtintensität des Fluoreszenzsignals der jeweiligen Spur normalisiert:

$$\text{relatives Signal} = \text{Signalintensität des Zielproteins} / \text{Signalintensität der SF Spur}$$

6.6 MikroRNA

6.6.1 Isolation der RNA

Für die miRNA-Expressionsanalysen wurde eine Isolation von kleinen und großen RNA-Spezies mit dem *MirVana™ miRNA Isolation Kit* der Firma Ambion nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Zellen wurden pelletiert und in Lysepuffer resuspendiert. Dazu wurde 1/10 Volumen an miRNA Homogenate-Puffer hinzugefügt und die Probe für 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgt die organische Extraktion mit 1 Volumen saurem Phenol:Chloroform und 1 min mischen des Ansatzes. Die Phenol-Fällung erfolgte durch Zentrifugation 10 min mit 10000 x g. Die wässrige

Phase (oben) wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit identischem Volumen 100 % Ethanol gemischt. Die gesamte Lösung wurde auf eine Zentrifugationssäule gegeben und 20 s bei 1000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Die anschließenden Waschschrte erfolgten 1 x mit Wash-Solution 1 und 2 x mit Wash-Solution 2 bzw. 3 für 20 s bei 10000 x g. Die Durchflussfraktion wurde verworfen. Die Elution der RNA erfolgte mit 40-50 µl Wasser (95 °C) in ein frisches Reaktionsgefäß.

6.6.2 Konzentrations-und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei 280 nm. Dies wird bei der photometrischen Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration genutzt. Durch die Bestimmung des Verhältnisses der Absorption bei 260 nm und 280 nm, lässt sich die Reinheit der Nukleinsäuren schätzen. Liegt der Quotient 260 nm/280 nm zwischen 1,8 und 2,0 ist die Reinheit der DNA-, bzw. RNA-Lösung gegeben. Bei einer Kontamination mit Proteinen, sinkt dieser Wert.

6.6.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese) von miRNAs für TaqMan®-MicroRNA-Array (TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit)

Zur Untersuchung der miRNA Expression in LCLs nach Bestrahlung wurden microRNA TaqMan Low Density Arrays (TLDA) der Firma Applied Biosystems verwendet. Die cDNA wurde nach den Anweisungen des Herstellers generiert. Die TLDA Human MicroRNA Panel A v2.0 Karte enthält 378 verschiedene, humane mikroRNAs. Darüber hinaus sind drei kleine nukleoläre RNAs (snoRNAs), U6 (SNORU6), RNU44 (SNORD44) und RNU48 (SNORD48), als endogene Kontrollen zur Normalisierung der Expressionsänderungen vorhanden. Die Multiplex reverse Transkription erfolgte mit Hilfe des TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kits. Die verwendeten RT Primer wurden aus einem definierten Primer Pool (Megaplex RT Primer Human Pool A V 2.1) eingesetzt und beinhalten alle auf dem Array vorhandenen miRNAs. Für jede 7,5 µl RT-Reaktion wurden 0,2 µl dNTPs, 0,1 µl RNase Inhibitor, 0,8 µl 10 x Reverse Transcription Buffer, 1,5 µl MultiScribe Reverse Transkriptase, 0,2 µl nukleasefreies H₂O, 0,8 µl Primer und 3 µl RNA (200 ng/µl Verdünnung) verwendet. Die Inkubation erfolgte nach folgendem Programm: 40 x (2 min bei 16 °C, 1 min bei

42 °C, 1 min bei 50 °C) und abschließend 5 min bei 85 °C. Die erhaltene cDNA kann entweder direkt für die Echtzeit-PCR weiter verwendet, oder bei –20 °C gelagert werden.

6.6.4 Reverse Transkription zur Detektion von spezifischen miRNAs (TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit)

Für die spezifische reverse Transkription von miRNAs, wurde das System der Firma Applied Biosystems nach Herstellerangaben verwendet. Um ausschließlich reife miRNAs zu transkribieren, werden bei dieser Detektionsmethode sog. looped RT-Primer eingesetzt, bei der für jede miRNA ein spezifischer Primer vorhanden ist. Hierfür wurden je 10 ng Gesamt-RNA mit der Konzentration 5 ng/μl für die Reaktion verwendet. Für jede 15 μl RT-Reaktion wurden 0,15 μl dNTPs, 0,19 μl RNase Inhibitor, 1,5 μl 10 x Reverse Transcription Buffer, 0,5 μl MultiScribe Reverse Transkriptase, 9,16 μl nukleasefreies H₂O, 1,5 μl Primer und 2 μl RNA gemischt. Der Ansatz wurde anschließend 30 min bei 16 °C, 30 min bei 42 °C und abschließend 5 min bei 85 °C inkubiert. Die erhaltene cDNA kann direkt für die PCR verwendet, oder bei –20 °C gelagert werden.

6.6.5 Quantitative Echtzeit (Real-time)-Polymerasekettenreaktion von miRNAs

Die Quantifizierung von spezifischen miRNAs erfolgte mit TaqMan®-Sonden. Die Fluoreszenz-Messung erfolgt dabei nach jedem Elongationsschritt. Der Schnittpunkt des gemessenen Signals mit einer Basislinie oberhalb des unspezifischen Hintergrundsignals wird als threshold cycle (Ct) bezeichnet, der durch die Anzahl der PCR-Zyklen angegeben wird. Die relative Regulation einer miRNA wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode berechnet. Hierbei wird die Formel $2^{-(\Delta\text{Ct}(\text{bestrahlt}) - \Delta\text{Ct}(\text{Kontrolle}))}$ genutzt, wobei $\Delta\text{Ct} = \text{Ct (miRNA)} - \text{Ct (Referenz-snoRNA)}$ entspricht. Zur Normalisierung der miRNA-Expression dient eine kleine, nukleoläre RNA (interner Standard).

6.6.6 Quantifizierung von miRNAs mittels TaqMan®-MicroRNA-Array

Zur Untersuchung von miRNA-Expressionsmustern, wurden microRNA TaqMan Low Density Arrays von Applied Biosystems gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die cDNA wurde aus 300 ng Gesamt-RNA mit spezifischen Multiplex reverse Transkriptase stem-loop Primern

generiert. Anschließend wurden 6 µl cDNA in 444 µl RNasefreiem H₂O verdünnt, mit 450 µl TaqMan 2 x Universal PCR Master Mix versetzt und zur Amplifikation auf Multi Fluidic Cards geladen. Die Messung der Genexpression erfolgte mittels eines ABI Prism 7900HT Systems. Die miRNA-Expression wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode quantifiziert, wobei die kleine RNA RNU6 als endogene Kontrolle zur Normalisierung diente.

6.6.7 Auswertung

Die Auswertung der MikroRNA-Analyse wurde von Dr. Anne Krämer am ISB des Helmholtz Zentrum München durchgeführt.

7 Literaturverzeichnis

2000. UNSCEAR 2000. The United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Health Phys 79: 314.

Aguilar-Mahecha A, Hassan S, Ferrario C, Basik M. 2006. Microarrays as validation strategies in clinical samples: tissue and protein microarrays. OMICS 10: 311-326.

Alban A, David SO, Bjorkesten L, Andersson C, Sloge E, Lewis S, Currie I. 2003. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. Proteomics 3: 36-44.

Andreassen CN, Alsner J, Overgaard J. 2002. Does variability in normal tissue reactions after radiotherapy have a genetic basis-where and how to look for it? Radiother Oncol 64: 131-140.

Bakkenist CJ, Kastan MB. 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. Nature 421: 499-506.

Baldeyron C, Jacquemin E, Smith J, Jacquemont C, De Oliveira I, Gad S, Feunteun J, Stoppa-Lyonnet D, Papadopoulou D. 2002. A single mutated BRCA1 allele leads to impaired fidelity of double strand break end-joining. Oncogene 21: 1401-1410.

Bartek J, Lukas J, Bartkova J. 2007. DNA damage response as an anti-cancer barrier: damage threshold and the concept of 'conditional haploinsufficiency'. Cell Cycle 6: 2344-2347.

Beamish H, Khanna KK, Lavin MF. 1994. Ionizing radiation and cell cycle progression in ataxia telangiectasia. Radiat Res 138: S130-133.

Beamish H, Williams R, Chen P, Lavin MF. 1996. Defect in multiple cell cycle checkpoints in ataxia-telangiectasia postirradiation. J Biol Chem 271: 20486-20493.

Bekker-Jensen S, Rendtlew Danielsen J, Fugger K, Gromova I, Nerstedt A, Lukas C, Bartek J, Lukas J, Mailand N. 2010. HERC2 coordinates ubiquitin-dependent assembly of DNA repair factors on damaged chromosomes. Nat Cell Biol 12: 80-86.

Bentzen SM, Overgaard J. 1994. Patient-to-Patient Variability in the Expression of Radiation-Induced Normal Tissue Injury. Semin Radiat Oncol 4: 68-80.

Berndt P, Hobohm U, Langen H. 1999. Reliable automatic protein identification from matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric peptide fingerprints. Electrophoresis 20: 3521-3526.

- Bird A. 2007. Perceptions of epigenetics. *Nature* 447: 396-398.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Braithwaite AW, Royds JA, et al. The p53 story: layers of complexity. *Carcinogenesis*. 2005;26(7):1161–1169
- Burnet NG, Wurm R, Peacock JH. 1996. Low dose-rate fibroblast radiosensitivity and the prediction of patient response to radiotherapy. *Int J Radiat Biol* 70: 289-300.
- Burnet NG, Johansen J, Turesson I, Nyman J, Peacock JH. 1998. Describing patients' normal tissue reactions: concerning the possibility of individualising radiotherapy dose prescriptions based on potential predictive assays of normal tissue radiosensitivity. Steering Committee of the BioMed2 European Union Concerted Action Programme on the Development of Predictive Tests of Normal Tissue Response to Radiation Therapy. *Int J Cancer* 79: 606-613.
- Bushati N, Cohen SM. 2007. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23: 175-205.
- Callinan PA, Feinberg AP. 2006. The emerging science of epigenomics. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 1: R95-101.
- Carthew RW, Sontheimer EJ. 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136: 642-655.
- Celis JE1, Kruhøffer M, Gromova I, Frederiksen C, Ostergaard M, Thykjaer T, Gromov P, Yu J, Pálsdóttir H, Magnusson N, Orntoft TF. 2000. Gene expression profiling: monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics. *FEBS Lett* 480: 2-16.
- Chang TC1, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, Feldmann G, Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ, Arking DE, Beer MA, Maitra A, Mendell JT. 2007. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell* 26: 745-52.
- Ciccia A, Elledge SJ. 2010. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* 40: 179-204.
- Cohen JI. 2000. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med* 343: 481-492.
- Cornforth MN, Bedford JS. 1985. On the nature of a defect in cells from individuals with ataxia-telangiectasia. *Science* 227: 1589-1591.

- Cortez D, Glick G, Elledge SJ. 2004. Minichromosome maintenance proteins are direct targets of the ATM and ATR checkpoint kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 10078-10083.
- Corthals GL, Wasinger VC, Hochstrasser DF, Sanchez JC. 2000. The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research. *Electrophoresis* 21: 1104-1115.
- Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, Bacchetti S. 1992. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 11: 1921-1929.
- Dahm-Daphi J, Dikomey E, Brammer I. 1998. DNA-repair, cell killing and normal tissue damage. *Strahlenther Onkol* 174 Suppl 3: 8-11.
- Dasika GK, Lin SC, Zhao S, Sung P, Tomkinson A, Lee EY. 1999. DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. *Oncogene* 18: 7883-7899.
- Dent P, Yacoub A, Contessa J, Caron R, Amorino G, Valerie K, Hagan MP, Grant S, Schmidt-Ullrich R. 2003. Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways. *Radiat Res* 159: 283-300.
- Deschavanne PJ, Debieu D, Fertil B, Malaise EP. 1986. Re-evaluation of in vitro radiosensitivity of human fibroblasts of different genetic origins. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 50: 279-293.
- Dickey JS, Zemp FJ, Martin OA, Kovalchuk O. 2011. The role of miRNA in the direct and indirect effects of ionizing radiation. *Radiat Environ Biophys* 50: 491-499.
- Digweed M. 1993. Human genetic instability syndromes: single gene defects with increased risk of cancer. *Toxicol Lett* 67: 259-281.
- Dikomey E, Borgmann K, Peacock J, Jung H. 2003. Why recent studies relating normal tissue response to individual radiosensitivity might have failed and how new studies should be performed. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 56: 1194-1200.
- Distel LV, Neubauer S, Keller U, Sprung CN, Sauer R, Grabenbauer GG. 2006. Individual differences in chromosomal aberrations after in vitro irradiation of cells from healthy individuals, cancer and cancer susceptibility syndrome patients. *Radiother Oncol* 81: 257-263.
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. 2004. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429: 457-463.

El-Awady RA, Dikomey E, Dahm-Daphi J. Heat effects on DNA repair after ionising radiation: hyperthermia commonly increases the number of non-repaired double-strand breaks and structural rearrangements. *Nucleic Acids Res* 2001 29: 1960-1966.

el-Deiry WS. 1998. Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol* 8: 345-357.

Elledge SJ. 1996. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274: 1664-1672.

Engle LJ, Simpson CL, Landers JE. 2006. Using high-throughput SNP technologies to study cancer. *Oncogene* 25: 1594-1601.

Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. 2010. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem* 79: 351-379.

Fei P, El-Deiry WS. P53 and radiation responses. *Oncogene*. 2003;22(37):5774–5783

Fenn JB. 2003. Electrospray wings for molecular elephants (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 42: 3871-3894.

Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 1: 2315-2319.

Frankenberg-Schwager M. 1989. Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by ionizing radiation. *Radiother Oncol* 14: 307-320.

Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19: 92-105.

Gaymes TJ, Mufti GJ, Rassool FV. 2002. Myeloid leukemias have increased activity of the nonhomologous end-joining pathway and concomitant DNA misrepair that is dependent on the Ku70/86 heterodimer. *Cancer Res* 62: 2791-2797.

Girardi C, De Pitta C, Casara S, Sales G, Lanfranchi G, Celotti L, Mognato M. 2012. Analysis of miRNA and mRNA expression profiles highlights alterations in ionizing radiation response of human lymphocytes under modeled microgravity. *PLoS One* 7: e31293.

Gorg A, Postel W, Gunther S. 1988. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9: 531-546.

Gorg A, Weiss W, Dunn MJ. 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4: 3665-3685.

- Grandjean P. 1995. Biomarkers in epidemiology. Clin Chem 41: 1800-1803.
- Greer S, Honeywell R, Geletu M, Arulanandam R, Raptis L. 2010. Housekeeping genes; expression levels may change with density of cultured cells. J Immunol Methods 355: 76-79.
- Greve B, Dreffke K, Rickinger A, Könemann S, Fritz E, Eckardt-Schupp F, Amler S, Sauerland C, Braselmann H, Sauter W, Illig T, Schmezer P, Gomolka M, Willich N, Bölling T. 2009. Multicentric investigation of ionising radiation-induced cell death as a predictive parameter of individual radiosensitivity. Apoptosis 14: 226-235.
- Greve B, Bölling T, Amler S, Rössler U, Gomolka M, Mayer C, Popanda O, Dreffke K, Rickinger A, Fritz E, Eckardt-Schupp F, Sauerland C, Braselmann H, Sauter W, Illig T, Riesenbeck D, Könemann S, Willich N, Mörtl S, Eich HT, Schmezer P. 2012. Evaluation of different biomarkers to predict individual radiosensitivity in an inter-laboratory comparison--lessons for future studies. PLoS One 7: 23.
- Gualandi G, Giselico L, Carloni M, Palitti F, Mosesso P, Alfonsi AM. 2001. Enhancement of genetic instability in human B cells by Epstein-Barr virus latent infection. Mutagenesis 16: 203-208.
- Gürtler A, Kraemer A, Roessler U, Hornhardt S, Kulka U, Moertl S, Friedl AA, Illig T, Wichmann E, Gomolka M. 2011. The WST survival assay: an easy and reliable method to screen radiation-sensitive individuals. Radiat Prot Dosimetry 143: 487-490.
- Gürtler A, Kunz N, Gomolka M, Hornhardt S, Friedl AA, McDonald K, Kohn JE, Posch A. 2013. Stain-Free technology as a normalization tool in Western Blot analysis. Anal Biochem 433: 105-111.
- Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R. 2000. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 9390-9395.
- Harper JW, Elledge SJ. 2007. The DNA damage response: ten years after. Mol Cell 28: 739-745.
- Heffernan TP, Simpson DA, Frank AR, Heinloth AN, Paules RS, Cordeiro-Stone M, Kaufmann WK. 2002. An ATR- and Chk1-dependent S checkpoint inhibits replicon initiation following UVC-induced DNA damage. Mol Cell Biol 22: 8552-8561.
- Helton ES, Chen X. p53 modulation of the DNA damage response. J. Cell Biochem. 2007;100(4):883–896
- Henderson A, Ripley S, Heller M, Kieff E. 1983. Chromosome site for Epstein-Barr virus DNA in a Burkitt tumor cell line and in lymphocytes growth-transformed in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A 80: 1987-1991.

Henderson S, Huen D, Rowe M, Dawson C, Johnson G, Rickinson A. 1993. Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 8479-8483.

Heroux MS, Chesnik MA, Halligan BD, Al-Gizawiy M, Connelly JM, Mueller WM, Rand SD, Cochran EJ, LaViolette PS, Malkin MG, Schmainda KM, Mirza SP. 2014. Comprehensive Characterization of Glioblastoma Tumor Tissues for Biomarker Identification using Mass Spectrometry-based Label-free Quantitative Proteomics. *Physiol Genomics* 6: 6.

Human Genome Structural Variation Working G, et al. 2007. Completing the map of human genetic variation. *Nature* 447: 161-165.

Jackson JG, Post SM, et al. Regulation of tissue- and stimulus-specific cell fate decisions by p53 in vivo. *J. Pathol.* 2011;223(2):127–136

Jiang X, Orr BA, Kranz DM, Shapiro DJ. 2006. Estrogen induction of the granzyme B inhibitor, proteinase inhibitor 9, protects cells against apoptosis mediated by cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. *Endocrinology* 147: 1419-1426.

Jiang X, Ellison SJ, Alarid ET, Shapiro DJ. 2007. Interplay between the levels of estrogen and estrogen receptor controls the level of the granzyme inhibitor, proteinase inhibitor 9 and susceptibility to immune surveillance by natural killer cells. *Oncogene* 26: 4106-4114.

Karas M, Hillenkamp F. 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 60: 2299-2301.

Kastan MB, Lim DS. 2000. The many substrates and functions of ATM. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 179-186.

Kataoka H, Tahara H, Watanabe T, Sugawara M, Ide T, Goto M, Furuichi Y, Sugimoto M. 1997. immortalization of immunologically committed Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines accompanied by a strong telomerase activity. *Differentiation* 62: 203-211.

Khanna KK, Lavin MF, Jackson SP, Mulhern TD. 2001. ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. *Cell Death Differ* 8: 1052-1065.

Khodarev NN, Beckett M, Labay E, Darga T, Roizman B, Weichselbaum RR: STAT1 is overexpressed in tumours selected for radioresistance and confers protection from radiation in transduced sensitive cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101(6):1714-1719.

Khodarev NN, Minn AJ, Efimova EV, Darga TE, Labay E, Beckett M, Mauceri HJ, Roizman B, Weichselbaum RR: Signal transducer and activator of transcription 1 regulates both cytotoxic and prosurvival functions in tumour cells. *Cancer Res* 2007, 67(19):9214-9220.

Klose J. 1975. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 26: 231-243.

Knowles MR, Cervino S, Skynner HA, Hunt SP, de Felipe C, Salim K, Meneses-Lorente G, McAllister G, Guest PC. 2003. Multiplex proteomic analysis by two-dimensional differential in-gel electrophoresis. *Proteomics* 3: 1162-1171.

Kraemer A, Anastasov N, Angermeier M, Winkler K, Atkinson MJ, Moertl S. 2011. MicroRNA-mediated processes are essential for the cellular radiation response. *Radiat Res* 176: 575-586.

Kraemer A, Barjaktarovic Z, Sarioglu H, Winkler K, Eckardt-Schupp, Tapio S, Atkinson MJ, Atkinson, Moertl S. Cell survival following radiation exposure requires miR-525-3p mediated suppression of ARRB1 and TXN1.

Kortlever RM, Higgins PJ, Bernards R. Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol* 8, 877-884 (2006).

Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB. 1992. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 7491-7495.

Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, et al. The essence of senescence. *Genes Dev* 24, 2463-2479 (2010).

Kusmann M, Raymond F, Affolter M. 2006. OMICS-driven biomarker discovery in nutrition and health. *J Biotechnol* 124: 758-787.

Lavin MF. 2008. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 759-769.

Lee JM, Lee KH, Farrell CJ, Ling PD, Kempkes B, Park JH, Hayward SD. 2004. EBNA2 is required for protection of latently Epstein-Barr virus-infected B cells against specific apoptotic stimuli. *J Virol* 78: 12694-12697.

Lees-Miller SP, Godbout R, Chan DW, Weinfeld M, Day RS, 3rd, Barron GM, Allalunis-Turner J. 1995. Absence of p350 subunit of DNA-activated protein kinase from a radiosensitive human cell line. *Science* 267: 1183-1185.

- Leung AK, Sharp PA. 2006. Function and localization of microRNAs in mammalian cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71: 29-38.
- Li Z, Owonikoko TK, Sun SY, Ramalingam SS, Doetsch PW, Xiao ZQ, Khuri FR, Curran WJ, Deng X. 2012. c-Myc suppression of DNA double-strand break repair. *Neoplasia* 14: 1190-1202.
- Long F, Liu H, Hahn C, Sumazin P, Zhang MQ, Zilberstein A. 2004. Genome-wide prediction and analysis of function-specific transcription factor binding sites. *In Silico Biol.* 4, 0033
- Lorimore SA, Wright EG. 2003. Radiation-induced genomic instability and bystander effects: related inflammatory-type responses to radiation-induced stress and injury? A review. *Int J Radiat Biol* 79: 15-25.
- Luo G, Yao MS, Bender CF, Mills M, Bladl AR, Bradley A, Petrini JH. 1999. Disruption of mRAD50 causes embryonic stem cell lethality, abnormal embryonic development, and sensitivity to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7376-7381.
- Levy DE, Darnell JE Jr: Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, 3(9):651-662.
- Manning AT, Garvin JT, Shahbazi RI, Miller N, McNeill RE, Kerin MJ. 2007. Molecular profiling techniques and bioinformatics in cancer research. *Eur J Surg Oncol* 33: 255-265.
- Marchetti F, Coleman MA, Jones IM, Wyrobek AJ. 2006. Candidate protein biodosimeters of human exposure to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 82: 605-639.
- Marcus K, Immler D, Sternberger J, Meyer HE. 2000. Identification of platelet proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis and analyzed by matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry and detection of tyrosine-phosphorylated proteins. *Electrophoresis* 21: 2622-2636.
- Maroschik B, Gurtler A, Kramer A, Rossler U, Gomolka M, Hornhardt S, Mortl S, Friedl AA. 2014. Radiation-induced alterations of histone post-translational modification levels in lymphoblastoid cell lines. *Radiat Oncol* 9: 9-15.
- Marouga R, David S, Hawkins E. 2005. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem* 382: 669-678.
- Matsuoka S, et al. 2007. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316: 1160-1166.

- McKinnon PJ. 2004. ATM and ataxia telangiectasia. *EMBO Rep* 5: 772-776.
- Meyn MS. 1999. Ataxia-telangiectasia, cancer and the pathobiology of the ATM gene. *Clin Genet* 55: 289-304.
- Miller G, Lipman M. 1973. Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70: 190-194.
- Mittelstrass K, Sauter W, Rosenberger A, Illig T, Timofeeva M, Klopp N, Dienemann H, Meese E, Sybrecht G, Woelke G, Cebulla M, Degen M, Morr H, Drings P, Groeschel A, Kreymborg KG, Haeussinger K, Hoeffken G, Schmidt C, Jilge B, Schmidt W, Ko YD, Taeuscher D, Chang-Claude J, Wichmann HE, Bickeboeller H, Risch A. 2008. Early onset lung cancer, cigarette smoking and the SNP309 of the murine double minute-2 (MDM2) gene. *BMC Cancer* 8: 113.
- Moeller BJ, Cao Y, Li CY, Dewhirst MW (2004) Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell* 5: 429–441.
- Moeller BJ, Dewhirst MW 2006. HIF-1 and tumour radiosensitivity. *Br J Cancer* 95: 1–5.
- Morgan WF, Hartmann A, Limoli CL, Nagar S, Ponnaiya B. 2002. Bystander effects in radiation-induced genomic instability. *Mutat Res* 504: 91-100.
- Morgan WF, Corcoran J, Hartmann A, Kaplan MI, Limoli CL, Ponnaiya B. 1998. DNA double-strand breaks, chromosomal rearrangements, and genomic instability. *Mutat Res* 404: 125-128.
- Mothersill C, Seymour C. 2001. Radiation-induced bystander effects: past history and future directions. *Radiat Res* 155: 759-767.
- Motoyama N, Naka K. 2004. DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. *Curr Opin Genet Dev* 14: 11-16.
- Munshi A, Ramesh R. 2013. Mitogen-Activated Protein Kinases and Their Role in Radiation Response. *Genes Cancer* 4: 401-408.
- Nakanishi K, Taniguchi T, Ranganathan V, New HV, Moreau LA, Stotsky M, Mathew CG, Kastan MB, Weaver DT, D'Andrea AD. 2002. Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response. *Nat Cell Biol* 4: 913-920.

- Neuhoff V, Stamm R, Pardowitz I, Arold N, Ehrhardt W, Taube D. 1990. Essential problems in quantification of proteins following colloidal staining with coomassie brilliant blue dyes in polyacrylamide gels, and their solution. *Electrophoresis* 11: 101-117.
- Nuta O, Moquet J, Bouffler S, Lloyd D, Sepai O, Rothkamm K. 2014. Impact of long-term exposure to sodium arsenite on cytogenetic radiation damage. *Mutagenesis* 29: 123-129.
- Okada M, Goto M, Furuichi Y, Sugimoto M. 1998. Differential effects of cytotoxic drugs on mortal and immortalized B-lymphoblastoid cell lines from normal and Werner's syndrome patients. *Biol Pharm Bull* 21: 235-239.
- Okada N, Lin CP, Ribeiro MC, Biton A, Lai G, He X, Bu P, Vogel H, Jablons DM, Keller AC, Wilkinson JE, He B, Speed TP, He L. 2014. A positive feedback between p53 and miR-34 miRNAs mediates tumor suppression. *Genes Dev* 28(5):438-50.
- Okubo M, Tsurukubo Y, Higaki T, Kawabe T, Goto M, Murase T, Ide T, Furuichi Y, Sugimoto M. 2001. Clonal chromosomal aberrations accompanied by strong telomerase activity in immortalization of human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. *Cancer Genet Cytogenet* 129: 30-34.
- Oppitz U, Baier K, Wulf J, Schakowski R, Flentje M. 2001. The in vitro colony assay: a predictor of clinical outcome. *Int J Radiat Biol* 77: 105-110.
- Pandey A, Mann M. 2000. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405: 837-846.
- Pappin DJ, Hojrup P, Bleasby AJ. 1993. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol* 3: 327-332.
- Pawlik TM, Keyomarsi K. 2004. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 59: 928-942.
- Pernot E, Hall J, Baatout S, Benotmane MA, Blanchardon E, Bouffler S, El Saghire H, Gomolka M, Guertler A, Harms-Ringdahl M, Jeggo P, Kreuzer M, Laurier D, Lindholm C, Mkacher R, Quintens R, Rothkamm K, Sabatier L, Tapio S, de Vathaire F, Cardis E. 2012. Ionizing radiation biomarkers for potential use in epidemiological studies. *Mutat Res*.
- Petrini JH. 1999. The mammalian Mre11-RAD50-nbs1 protein complex: integration of functions in the cellular DNA-damage response. *Am J Hum Genet* 64: 1264-1269.
- Pluder F, Barjaktarovic Z, Azimzadeh O, Mörtl S, Krämer A, Steininger S, Sarioglu H, Leszczynski D, Nylund R, Hakanen A, Sriharshan A, Atkinson MJ, Tapio S. 2011. Low-dose irradiation causes rapid

alterations to the proteome of the human endothelial cell line EA.hy926. *Radiat Environ Biophys* 50: 155-166.

Polo SE, Jackson SP. Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Dev.* 2011;25(5):409–433

Raaphorst GP, Malone S, Alsbeih G, Souhani L, Szumacher E, Girard A. 2002. Skin fibroblasts in vitro radiosensitivity can predict for late complications following AVM radiosurgery. *Radiother Oncol* 64: 153-156.

Rabilloud T, Vuillard L, Gilly C, Lawrence JJ. 1994. Silver-staining of proteins in polyacrylamide gels: a general overview. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 40: 57-75.

Rabin H, Neubauer RH, Hopkins RF, 3rd, Rasheed S. 1978. In vitro lymphocyte transformation by Epstein-Barr virus (EBV)-like viruses isolated from Old-World non-human primates. *IARC Sci Publ*: 553-557.

Rashi-Elkeles S, Elkon R, Shavit S, Lerenthal Y, Linhart C, Kupershtein A, Amariglio N, Rechavi G, Shamir R, Shiloh Y. 2011. Transcriptional modulation induced by ionizing radiation: p53 remains a central player. *Mol Oncol* 5: 336-348.

Reiman A, Srinivasan V, Barone G, Last JJ, Wootton LL, Davies EG, Verhagen MM, Willemsen MA, Weemaes CM, Byrd PJ, Izatt L, Easton DF, Thompson DJ, Taylor AM. 2011. Lymphoid tumours and breast cancer in ataxia telangiectasia; substantial protective effect of residual ATM kinase activity against childhood tumours. *Br J Cancer* 105: 586-591.

Renwick A, Thompson D, Seal S, Kelly P, Chagtai T, Ahmed M, North B, Jayatilake H, Barfoot R, Spanova K, McGuffog L, Evans DG, Eccles D; Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK), Easton DF, Stratton MR, Rahman N. 2006. ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. *Nat Genet* 38: 873-875.

Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008;9(5):402–412

Rogers LF. 2000. The National Council on Radiation Protection and Measurements: a vital agency for our specialty. *AJR Am J Roentgenol* 175: 1493.

Rokhlin OW, Scheinker VS, Taghiyev AF, Bumcrot D, Glover RA, Cohen MB. 2008. MicroRNA-34 mediates AR-dependent p53 induced apoptosis in prostate cancer. *Cancer Biol Ther* 7: 1288-96

Rooney CM, Rickinson AB, Moss DJ, Lenoir GM, Epstein MA. 1984. Paired Epstein-Barr virus-carrying lymphoma and lymphoblastoid cell lines from Burkitt's lymphoma patients: comparative sensitivity to non-specific and to allo-specific cytotoxic responses in vitro. *Int J Cancer* 34: 339-348.

Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett* 2013 332: 237-248. doi: 210.1016/j.canlet.2012.1001.1007. Epub 2012 Jan 1017.

Russell NS, Begg AC. 2002. Editorial radiotherapy and oncology 2002: predictive assays for normal tissue damage. *Radiother Oncol* 64: 125-129.

Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL, Hunt SE, Cole CG, Coggill PC, Rice CM, Ning Z, Rogers J, Bentley DR, Kwok PY, Mardis ER, Yeh RT, Schultz B, Cook L, Davenport R, Dante M, Fulton L, Hillier L, Waterston RH, McPherson JD, Gilman B, Schaffner S, Van Etten WJ, Reich D, Higgins J, Daly MJ, Blumenstiel B, Baldwin J, Stange-Thomann N, Zody MC, Linton L, Lander ES, Altshuler D; International SNP Map Working Group. 2001. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 409: 928-933.

Sarioglu H, Brandner S, Jacobsen C, Meindl T, Schmidt A, Kellermann J, Lottspeich F, Andrae U. 2006. Quantitative analysis of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced proteome alterations in 5L rat hepatoma cells using isotope-coded protein labels. *Proteomics* 6: 2407-2421.

Samuel CE: Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 2001, 14(4):778-809.

Sauter W, Rosenberger A, Beckmann L, Kropp S, Mittelstrass K, Timofeeva M, Wölke G, Steinwachs A, Scheiner D, Meese E, Sybrecht G, Kronenberg F, Dienemann H; LUCY-Consortium, Chang-Claude J, Illig T, Wichmann HE, Bickeböller H, Risch A. 2008. Matrix metalloproteinase 1 (MMP1) is associated with early-onset lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17: 1127-1135.

Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali SR, Simmons A, Clines GA, Sartiel A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jaspers NG, Taylor AM, Arlett CF, Miki T, Weissman SM, Lovett M, Collins FS, Shiloh Y. 1995. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 268: 1749-1753.

Schmidt A, Kellermann J, Lottspeich F. 2005. A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. *Proteomics* 5: 4-15.

- Schneider U, zur Hausen H. 1975. Epstein-Barr virus-induced transformation of human leukocytes after cell fractionation. *Int J Cancer* 15: 59-66.
- Semenza GL (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3: 721–732.
- Shaw J, Rowlinson R, Nickson J, Stone T, Sweet A, Williams K, Tonge R. 2003. Evaluation of saturation labelling two-dimensional difference gel electrophoresis fluorescent dyes. *Proteomics* 3: 1181-1195.
- Shen F, Zhang Y, Yao Y, Hua W, Zhang HS, Wu JS, Zhong P, Zhou LF. 2014. Proteomic analysis of cerebrospinal fluid: toward the identification of biomarkers for gliomas. *Neurosurg Rev* 1: 1.
- Shi YQ, Li L, Sanal O, Tezcan I, Emery GC, Blattmann H, Crompton NE. 2001. High levels of delayed radiation-induced apoptosis observed in lymphoblastoid cell lines from ataxia-telangiectasia patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49: 555-559.
- Skvortsova I, Skvortsov S, Stasyk T, Raju U, Popper BA, Schiestl B, von Guggenberg E, Neher A, Bonn GK, Huber LA, Lukas P. 2008. Intracellular signaling pathways regulating radioresistance of human prostate carcinoma cells. *Proteomics* 8: 4521-4533.
- Smith L, Qutob O, Watson MB, Beavis AW, Potts D, Welham KJ, Garimella V, Lind MJ, Drew PJ, Cawkwell L. 2009. Proteomic identification of putative biomarkers of radiotherapy resistance: a possible role for the 26S proteasome? *Neoplasia* 11: 1194-1207.
- Smolka MB, Zhou H, Purkayastha S, Aebersold R. 2001. Optimization of the isotope-coded affinity tag-labeling procedure for quantitative proteome analysis. *Anal Biochem* 297: 25-31.
- Steinwart I, Christmann A: *Support Vector Machines*, Springer, New York, 2008. ISBN 978-0-387-77241-7. 602 pp.
- Storch K, Eke I, Borgmann K, Krause M, Richter C, Becker K, Schrock E, Cordes N. 2010. Three-dimensional cell growth confers radioresistance by chromatin density modification. *Cancer Res* 70: 3925-3934.
- Sriharshan A, Azimzadeh O, Caldwell RB, Tapio S. 2014. Proteomic strategies: SILAC and 2D-DIGE- powerful tool to investigate cellular alterations. *Methods Mol Biol*: 721-721_718.
- Sudo H, Tsuji AB, Sugyo A, Imai T, Saga T, Harada YN. 2007. A loss of function screen identifies nine new radiation susceptibility genes. *Biochem Biophys Res Commun* 364: 695-701.

- Tarasov V, Jung P, Verdoodt B, Lodygin D, Epanchintsev A, Menssen A, Meister G, Hermeking H. Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle* 6: 1586-93.
- Taylor AM, Harnden DG, Arlett CF, Harcourt SA, Lehmann AR, Stevens S, Bridges BA. 1975. Ataxia telangiectasia: a human mutation with abnormal radiation sensitivity. *Nature* 258: 427-429.
- Taylor AM. 1978. Unrepaired DNA strand breaks in irradiated ataxia telangiectasia lymphocytes suggested from cytogenetic observations. *Mutat Res* 50: 407-418.
- Terry DE, Desiderio DM. 2003. Between-gel reproducibility of the human cerebrospinal fluid proteome. *Proteomics* 3: 1962-1979.
- Tonge R, Shaw J, Middleton B, Rowlinson R, Rayner S, Young J, Pognan F, Hawkins E, Currie I, Davison M. 2001. Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* 1: 377-396.
- Towbin H, Ozbey O, Zingel O. 2001. An immunoBlotting method for high-resolution isoelectric focusing of protein isoforms on immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 22: 1887-1893.
- Tsao CC, Geisen C, Abraham RT. 2004. Interaction between human MCM7 and Rad17 proteins is required for replication checkpoint signaling. *EMBO J* 23: 4660-4669.
- Turesson I, Carlsson J, Brahme A, Glimelius B, Zackrisson B, Stenerlow B, Swedish Cancer Society Investigation G. 2003. Biological response to radiation therapy. *Acta Oncol* 42: 92-106.
- Tuteja N, Tuteja R. 2001. Unraveling DNA repair in human: molecular mechanisms and consequences of repair defect. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 36: 261-290.
- Unlu M, Morgan ME, Minden JS. 1997. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18: 2071-2077.
- van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R. 2001. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet* 2: 196-206.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. 2000. Surfing the p53 network. *Nature* 408: 307-310.
- Waltes R, Kalb R, Gatei M, Kijas AW, Stumm M, Sobock A, Wieland B, Varon R, Lerenthal Y, Lavin MF, Schindler D, Dörk T. 2009. Human RAD50 deficiency in a Nijmegen breakage syndrome-like disorder. *Am J Hum Genet* 84: 605-616.

Weichselbaum RR, Ishwaran H, Yoon T, Nuyten DS, Baker SW, Khodarev N, Su AW, Shaikh AY, Roach P, Kreike B, et al.: An interferon- related gene signature for DNA damage resistance is a predictive marker for chemotherapy and radiation for breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, 105(47):18490-18495.

Weinert T. 1998. DNA damage and checkpoint pathways: molecular anatomy and interactions with repair. *Cell* 94: 555-558.

Woods DB, Vousden KH. 2001. Regulation of p53 function. *Exp Cell Res* 264: 56-66.

Wu X, Gu J, Spitz MR. 2007. Mutagen sensitivity: a genetic predisposition factor for cancer. *Cancer Res* 67: 3493-3495.

Wu X, Spitz MR, Amos CI, Lin J, Shao L, Gu J, de Andrade M, Benowitz NL, Shields PG, Swan GE. 2006. Mutagen sensitivity has high heritability: evidence from a twin study. *Cancer Res* 66: 5993-5996.

Yates J, Warren N, Reisman D, Sugden B. 1984. A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 3806-3810.

Yentrapalli R, Azimzadeh O, Sriharshan A, Malinowsky K, Merl J, Wojcik A, Harms-Ringdahl M, Atkinson MJ, Becker KF, Haghdoust S, Tapio S. 2013. The PI3K/Akt/mTOR pathway is implicated in the premature senescence of primary human endothelial cells exposed to chronic radiation. *PLoS One* 8.

Zamzami N, Kroemer G. p53 in apoptosis control: an introduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005;331(3):685–687

Zhao R, Gish K, Murphy M, Yin Y, Notterman D, Hoffman WH, Tom E, Mack DH, Levine AJ. 2000. The transcriptional program following p53 activation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 65: 475-482.

Zubarev RA, Horn DM, Fridriksson EK, Kelleher NL, Kruger NA, Lewis MA, Carpenter BK, McLafferty FW. 2000. Electron capture dissociation for structural characterization of multiply charged protein cations. *Anal Chem* 72: 563-573.

8. Anhang

Tabelle 1: Gemessene Zellviabilität (%) nach Bestrahlung mit 10 Gy in 92 LUCY-Zelllinien.

Die Daten wurden mit dem WST-1 Test generiert.

Zelllinie	10 Gy 24 h (%)	10 Gy 48 h (%)
3008-200	76,9	67,3
3012-200	84,8	66,5
4008-200	46,4	38,3
4013-200	70,6	45,9
4017-200	64,4	44,2
4028-200	52,9	40,6
4029-200	58,5	51,3
4037-200	57,9	52,8
4039-200	44,4	39,0
4040-200a	62,5	59,6
4040-200b	44,9	35,1
4048-200	50,0	47,3
4049-200	67,0	50,7
4054-200	60,3	49,8
4060	37,0	27,6
4064-200	54,6	50,3
4068-200	72,9	57,2
4095-200	76,3	65,0
4104-200	59,0	53,2
4109-200	59,6	53,0
4113-200	54,5	51,4
4119-200	64,8	54,7
4120-200	63,9	50,9
5003-200	55,6	52,6
6008-200	59,8	46,4
7005-200	63,3	58,3
8001-200	63,6	59,6
8002-200	65,4	51,7
8003-200	62,9	57,4
8035-200	70,9	59,3
8039-200	59,4	43,8
8041-200	65,3	54,8
8042-200	64,5	48,2
8044-200	59,2	46,1
8050-200	46,7	47,7
8059-200	47,2	48,1
8063-200	66,1	55,8
8077-200	60,6	57,7
9004-200	53,2	45,4
9012-200	52,5	47,4
11031-200	74,7	68,6

Zelllinie	10 Gy 24 h (%)	10 Gy 48 h (%)
12018-200	73,6	65,6
12021-200	58,4	50,5
13004-200	56,7	48,6
13007-200	53,5	45,8
13013-200	65,9	59,7
13019-200	65,3	58,4
13026-200	59,7	47,5
13044-200	84,6	64,1
13050-200	68,7	53,9
13060-200	70,5	64,4
13073-200	71,7	70,5
13074-200	57,8	51,5
16004-200	68,4	66,7
16034-200	86,4	62,3
17025-200	74,3	68,4
19006-200	83,5	80,5
19022-200	56,5	55,0
19033-200	69,1	63,4
19037-200	78,9	62,7
20003-200	66,3	56,1
20007-200	57,1	48,0
20009-200	76,0	63,8
20015-200	95,1	72,1
20022-200	84,4	77,2
20024-200	59,1	45,4
20037-200	85,0	80,2
20038-200	50,4	34,8
20045-200	70,9	68,1
20073-200	59,8	58,0
29004-200	77,3	65,9
29010-200	78,2	66,6
29011-200	67,8	51,20
29012-200	94,7	71,3
29019-200	70,9	68,6
29023-200	89,3	73,4
29024-200	54,4	53,8
29025-200	79,2	66,6
29027-200	67,8	63,7
29029-200	63,3	56,6
29033-200	68,0	66,5
32003-200	68,2	57,8
32004-200	81,2	72,0
33001-200	88,9	84,0
34002-200	76,9	65,3
36004-200	80,4	75,4
36008-200	61,3	48,6
36011-200	45,3	43,6
36012-200	65,7	60,4
36014-200	69,9	63,4

Anhang

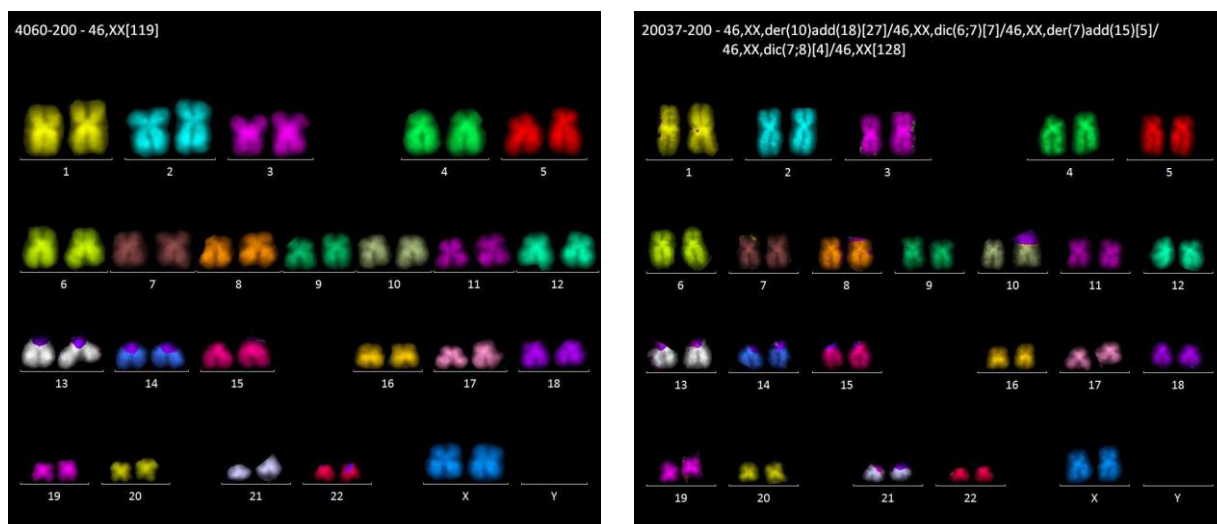
Zelllinie	10 Gy 24 h (%)	10 Gy 48 h (%)
44035-200	78,8	73,1
44038-200	62,6	58,4

Tabelle 2: Übersicht über die verschiedenen Karyotypen der untersuchten lymphoblastoiden Zelllinien

Linie	Karyotyp	weitere Klone
HuKo	46,XY [8]	46,XY,der(19)add(13) [25] 47,XY,+8 [12] 46,XY,der(19)add(11) [4]
GM03323(+)	46,XY [99]	45,XY,-19 [3]
GM03189(-)	46,XY [92]	46,XY,der(22)add(20) [5] 46,XY,der(22)add(3) [2]
4060	46,XX [119]	-----
20037	46,XX [128]	46,XX,der(10)add(18) [27] 46,XX,dic(6;7) [7] 46,XX,der(7)add(15) [5] 46,XX,dic(7;8) [4]

Die Ziffern in eckigen Klammern geben die Anzahl der ausgewerteten Metaphasen mit dem jeweiligen Klon an.

Abbildung 1: Repräsentative mFISH-Karyogramme der analysierten LCLs 4060, 20037, HuKo, GM03189(-) und GM03323(+)



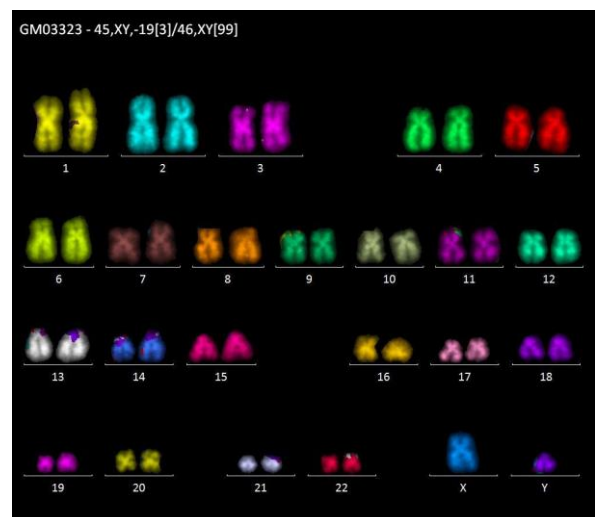
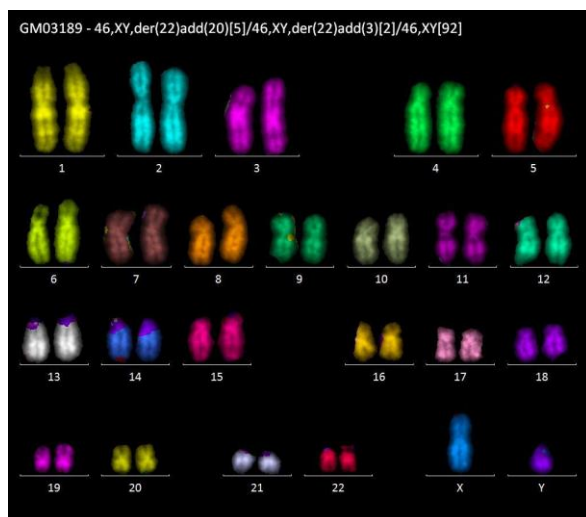
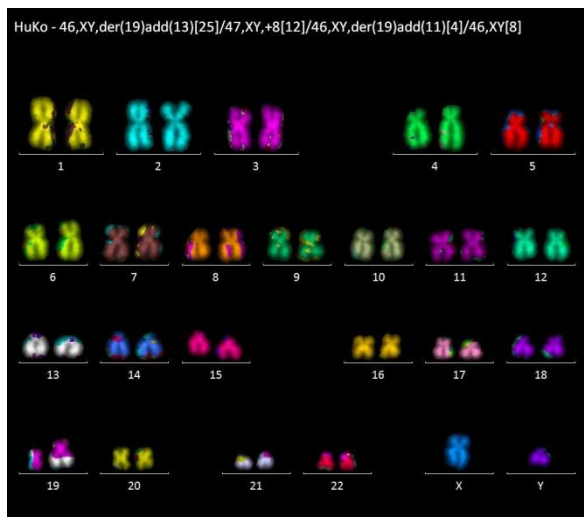


Tabelle 3 A: Differenziell exprimierte Proteine der Zelllinie HuKo nach Bestrahlung mit 1 Gy. Die Tabelle zeigt die Regulationsfaktoren zu den drei Zeitpunkten nach Bestrahlung, sowie den Proteinnamen, den Gennamen und die Zugangsnummern der Proteine aus der Protein-Datenbank SwissProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/?query=reviewed%3Ayes>). Nicht signifikant regulierte Proteine sind kursiv dargestellt. Die Proteine sind nach absteigendem Regulationsfaktor 24 h post-Bestrahlung geordnet

Gen Name	Protein Name	SwissProt-Zugangsnr	0,5h	4h	24h	1-ANOVA
HNRNPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	P61978	1,07	1,12	1,25	0,05
HNRNPH1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	P31943	1,07	1,12	1,22	0,022
ALB	Serum albumin	P02768	1,07	1,02	1,2	0,0098
LRPPRC	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	P42704	1,04	1,04	1,14	0,0037
HSP90AB1	Heat shock protein HSP 90-beta	P08238	1,1	1,04	1,13	0,05
IMMT	Mitochondrial inner membrane protein	Q16891	1,06	1,02	1,13	0,033
LCP1	Plastin-2	P13796	1,01	-1,31	1,12	0,032
ATP6V1B2	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	P21281	1,13	1,12	1,05	0,0075
CFL1	Cofilin-1	P23528	1,14	1,07	1,03	0,05
ATP5B	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	P06576	-1,07	-1,12	-1,05	8,70E-05
SHROOM3	Protein Shroom3	Q8TF72	-1,1	-1,15	-1,07	0,05
PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	P62937	-1,15	-1,14	-1,07	0,041
PRDX3	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	P30048	-1,08	-1,12	-1,08	0,02
PGAM	Phosphoglycerate mutase 1	P18669	1,1	1,07	-1,11	0,05
ACO2	Aconitate hydratase, mitochondrial	Q99798	-1,08	-1,06	-1,14	0,0097
9606 [NCBI]	Leucine-rich repeat-containing protein ENSP00000371558	A6NJI9	-1,17	-1,19	-1,19	0,0037
NDUFS1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	P28331	-1,06	-1,16	-1,22	0,0048
ACTB	Actin, cytoplasmic 1	P60709	-1,28	-1,27	-1,43	0,038

Tabelle 3 B: Differenziell exprimierte Proteine der Zelllinie HuKo nach Bestrahlung mit 10 Gy. Die Tabelle zeigt die Regulationsfaktoren zu den drei Zeitpunkten nach Bestrahlung, sowie den Proteinnamen, den Gennamen und die Zugangsnummern der Proteine aus der Protein-Datenbank SwissProt.

Gen Name	Protein Name	SwissProt-Zugangsnr	0,5h	4h	24h	1-ANOVA
ACTB	Actin, cytoplasmic 1	P60709	1,73	1,08	1,59	0,05
SERPINB9	Serpin B9	P50453	1,02	1,04	1,27	0,034
DDB1	DNA damage-binding protein 1	Q16531	1,12	1,36	1,24	0,049
HSPD1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	P10809	1,49	1,19	1,23	0,0088
XRCC5	X-ray repair cross-complementing protein 5	P20591	1,1	1,06	1,19	0,017
CSK	Tyrosine-protein kinase CSK	P41240	1,41	1,04	1,16	0,033
DLD	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	P09622	1,03	1,04	1,14	0,011
LCP1	Plastin-2	P13796	1,05	-1,13	1,13	0,033
CAP1	Adenylyl cyclase-associated protein 1	Q01518	1,02	1,01	1,13	0,031
PDLIM1	PDZ and LIM domain protein 1	O00151	1,03	1,12	1,13	0,025
EHD1	EH domain-containing protein 1	Q9H4M9	1,01	1,03	1,11	0,02
PA2G4	Proliferation-associated protein 2G4	Q9UQ80	1,01	1,03	1,1	0,037
DPYSL2	Dihydropyrimidinase-related protein 2	Q16555	1	-1,11	1,07	0,031
LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain	P00338	-1,11	1,15	1,06	0,0095
GDI2	Rab GDP dissociation inhibitor beta	P50395	1,02	1,11	1,06	0,043
PDIA6	Protein disulfide-isomerase A6	Q15084	-1,13	-1,08	1,01	0,018
MSH2	DNA mismatch repair protein Msh2	P43246	-1,08	-1,11	-1,02	0,0078
PFKP	6-phosphofructokinase type C	P13639	-1,16	1,22	-1,03	0,05
ANXA11	Annexin A11	P50995	1,01	-1,16	-1,06	0,023
IMPDH2	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	P12268	1,04	-1,28	-1,07	0,0023
FKBP4	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4	Q0279	-1,06	-1,12	-1,08	0,0095
CORO7	Coronin-7	P57737	-1,13	-1,18	-1,1	0,022
STARD8	StAR-related lipid transfer protein 8	Q92502	-1,02	-1,12	-1,13	0,023
MX1	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1	Q01813	1,08	1,22	-1,17	0,036

Tabelle 3 C: Differenziell exprimierte Proteine der Zelllinie GM03323(+) nach Bestrahlung mit 1 Gy. Die Tabelle zeigt die Regulationsfaktoren zu den drei Zeitpunkten nach Bestrahlung, sowie den Proteinennamen, den Gennamen und die Zugangsnummern der Proteine aus der Protein-Datenbank SwissProt.

Gen Name	Protein Name	Swissprot-Zugangsnr	0,5h	4h	24h	1-ANOVA
MX1	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1	P20591	1,02	1,02	1,21	0,0096
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	P42224	-1,01	1,09	1,15	0,05
EZR	Ezrin	P15311	1,04	1,05	1,14	0,022
HNRNPH1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	P31943	1,01	1,2	1,14	0,034
ENO1	Alpha-enolase	P06733	1,01	1,17	1,14	0,05
OGDH	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	Q02218	1,04	1,1	1,13	0,0096
XRCC6	X-ray repair cross-complementing protein 6	P12956	1,02	1,11	1,06	0,047
NAMT	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	P43490	1,02	-1,12	1,05	0,019
ALB	Serum albumin	P02768	1,07	1,22	1,02	0,0097
UBE2I	SUMO-conjugating enzyme UBC9	P63279	-1,03	-1,26	-1,04	0,013
PPP2CB	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform	P62714	1,13	1,06	-1,05	0,032
ACO1	Cytoplasmic aconitate hydratase	P21399	1,02	1,22	-1,08	0,018
ACTG1	Actin, cytoplasmic 2	P63261	-1,13	-1,33	-1,19	0,047

Tabelle 3 D: Differenziell exprimierte Proteine der Zelllinie GM03323(+) nach Bestrahlung mit 10 Gy. Die Tabelle zeigt die Regulationsfaktoren zu den drei Zeitpunkten nach Bestrahlung, sowie den Proteinennamen, den Gennamen und die Zugangsnummern der Proteine aus der Protein-Datenbank SwissProt.

Gen Name	Protein Name	SwissProt-Zugangsnr	0,5h	4h	24h	1-ANOVA
ACTG1	Actin, cytoplasmic 2	P63261	1,09	1,07	1,64	0,0008
ACTB	Actin, cytoplasmic	P60709	1,03	1,17	1,45	0,0073
HSPA5	78 kDa glucose-regulated protein	P1102	1,01	1,04	1,25	0,027
ANX4	Annexin A4	P09525	1,02	1,09	1,22	0,015
CORO1C	Coronin-1C	Q9ULV4	1,04	-1,17	1,21	0,019
PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3	P30101	1,03	1,05	1,2	0,0097
UQCRC1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	P31930	-1,01	1	1,2	0,05
P4HB	Protein disulfide-isomerase	P07237	-1,09	1,06	1,19	0,043

Gen Name	Protein Name	SwissProt-Zugangsnr	0,5h	4h	24h	1-ANOVA
HSP90B1	Endoplasmin	P14625	1,04	1,07	1,18	0,04
PRKAR1A	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	P10644	-1,05	-1,04	1,16	0,038
GANAB	Neutral alpha-glucosidase AB	Q14697	1,01	1,03	1,14	0,0039
HNRNPH1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	P31943	1,09	1,06	1,13	0,05
PDIA6	Protein disulfide-isomerase A6	Q15084	1,04	1,07	1,12	0,032
MX1	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1	P20591	-1,1	1,04	1,11	0,05
ATP5A1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	P25705	1,01	1,02	1,1	0,0091
LMNA	Prelamin-A/C	P02545	-1,06	-1,11	-1,01	0,0089
MCM7	DNA replication licensing factor MCM7	P33993	-1,05	-1,01	-1,11	0,05
LDHB	L-lactate dehydrogenase B chain	P07195	1,02	-1,01	-1,11	0,0078
SERBP1	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	Q8NC51	-1,03	-1,11	-1,12	0,045
GDI2	Rab GDP dissociation inhibitor beta	P50395	-1,04	-1,04	-1,13	0,0027
ARHGDIA	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	P52565	-1,04	-1,1	-1,13	0,042
PHGDH	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	O43175	1,07	1,01	-1,14	0,05
HNRNPU	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	Q00839	-1,04	-1,07	-1,3	0,028
EEF2	Elongation factor 2	P13639	1,02	-1,07	-1,58	0,0071
RABGAP1L	Rab GTPase-activating protein 1-like	Q5R372	1,13	-1,51	-2,25	0,031

Tabelle 3 E: Differentiell exprimierte Proteine der Zelllinie GM03189(-) nach Bestrahlung mit 1 Gy. Die Tabelle zeigt die Regulationsfaktoren zu den drei Zeitpunkten nach Bestrahlung, sowie den Proteinnamen, den Gennamen und die Zugangsnummern der Proteine aus der Protein-Datenbank SwissProt.

Gen Name	Protein Name	SwissProt-Zugangsnr	0,5h	4h	24h	1-ANOVA
EEF2	Elongation factor 2	P13639	-1,28	1,19	1,62	0,021
ANXA6	Annexin A6	P08133	-1,03	1,02	1,4	0,036
PFKFB1	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 1	P16118	1,05	1,05	1,35	0,036
LRPPRC	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	P42704	1,06	1,06	1,33	0,05
MAP2	Microtubule-associated protein 2	P11137	1,11	1,18	1,25	0,0078

Gen Name	Protein Name	SwissProt-Zugangsnr	0,5h	4h	24h	1-ANOVA
EIF4A1	Eukaryotic initiation factor 4A-I	P60842	1,05	1,07	1,24	0,036
HSPH1	Heat shock protein 105 kDa	Q92598	-1,01	-1,06	1,12	0,015
CORO1A	Coronin-1A	P31146	-1,07	-1,05	1,1	0,0042
RPSA	40S ribosomal protein SA	P08865	-1,07	1,25	1,09	0,025
STARD8	StAR-related lipid transfer protein 8	Q92502	-1,02	-1,05	-1,1	0,036
ACTG1	Actin, cytoplasmic 2	P63261	-1,17	-1,2	-1,1	0,023
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P04406	-1,14	-1,1	-1,1	0,0097
NDUFS1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	P28331	-1,13	-1,27	-1,13	0,0088
LMNB1	Lamin-B1	P20700	-1,04	-1,1	-1,14	0,011
ENO1	Alpha-enolase	P06733	-1,14	-1,05	-1,16	0,029
LCP1	Plastin-2	P13796	-1,12	-1,01	-1,19	0,033
PSMC6	26S protease regulatory subunit 10B	P62333	-1,14	-1,04	-1,19	0,023
ARHGDIA	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	P52565	-1,09	-1,09	-1,24	0,047
ALB	Serum albumin	P02768	-1,1	-1,1	-1,26	0,05
VIP	VIP peptides	P01282	-1,06	-1,25	-1,27	0,02
ERO1L	ERO1-like protein alpha	Q96HE7	-1,12	-1,14	-1,38	0,05
PHB	Prohibitin	P35232	-1,1	-1,05	-1,53	0,036

Tabelle 3 F: Differenziell exprimierte Proteine der Zelllinie GM03189(-) nach Bestrahlung mit 10 Gy. Die Tabelle zeigt die Regulationsfaktoren zu den drei Zeitpunkten nach Bestrahlung, sowie den Proteinnamen, den Gennamen und die Zugangsnummern der Proteine aus der Protein-Datenbank SwissProt.

Gen Name	Protein Name	SwissProt-Zugangsnr	0,5h	4h	24h	1-ANOVA
XRCC5	X-ray repair cross-complementing protein 5	P13010	1,04	1,07	1,43	0,0075
SUV39H1	Histone-lysine N-methyltransferase SUV39H1	O43463	1	1,06	1,24	0,035
EIF3A	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	Q14152	-1,02	1,08	1,24	0,047
NCF2	Neutrophil cytosol factor 2	P19878	1,05	1,08	1,24	0,0096
STAT5A	Signal transducer and activator of transcription 5A	P42229	1,19	1,2	1,16	0,011
LRPPRC	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	P19367	1,05	1,15	1,12	0,034
HNRNPH1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	P31943	1,04	1,1	1,11	0,05

Gen Name	Protein Name	SwissProt-Zugangsnr	0,5h	4h	24h	1-ANOVA
ACTN4	Alpha-actinin-4	O43707	-1,01	-1,11	1,1	0,0021
WARS	Tryptophanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	P23381	1,06	-1,02	1,1	0,048
PLCG2	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2	P16885	1,06	-1,11	-1,03	0,05
APEH	Acylamino-acid-releasing enzyme	P13798	-1,06	-1,11	-1,05	0,047
EZR	Ezrin	P15311	-1,03	-1,15	-1,07	0,05
ACO2	Aconitate hydratase, mitochondrial	Q99798	-1,04	-1,05	-1,1	0,043
RUVBL1	RuvB-like 1	Q9Y265	-1,06	-1,14	-1,1	0,05
ERO1L	ERO1-like protein alpha	Q96HE7	-1,12	-1,06	-1,12	0,05
ALDOC	Fructose-bisphosphate aldolase C	P09972	-1,02	1	-1,13	0,05
GARS	Glycyl-tRNA synthetase	P41250	1,05	-1,28	-1,16	0,037
TRAP1	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	Q12931	-1,03	-1,04	-1,16	0,05
TLN1	Talin-1	Q9Y490	-1,18	-1,3	-1,18	0,05
TUBA1B	Tubulin alpha-1B chain	P68363	-1,05	-1,01	-1,19	0,05
MSN	Moesin	P26038	-1,04	-1,38	-1,24	0,0071
RAD50	DNA repair protein RAD50	Q92878	1,02	-1,22	-1,3	0,027
ZBED4	Zinc finger BED domain-containing protein 4	O75132	-1,04	-1,23	-1,42	0,013
EEF2	Elongation factor 2	P13639	1,01	-1,91	-1,42	0,0021

Tabelle 3 G: Differenziell exprimierte Proteine der Zelllinie 4060 nach Bestrahlung mit 1 Gy. Die Tabelle zeigt die Regulationsfaktoren zu den drei Zeitpunkten nach Bestrahlung, sowie den Proteinnamen, den Gennamen und die Zugangsnummern der Proteine aus der Protein-Datenbank SwissProt.

Gen Name	Protein Name	SwissProt-Zugangsnr	0,5h	4h	24h	1-ANOVA
LRPPRC	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	P42704	1	1,03	1,26	0,02
UBA6	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6	A0AVT1	1	1,05	1,22	0,031
THOP1	Thimet oligopeptidase	P52888	1,1	-1,03	1,22	0,034
MYH9	Myosin-9	P35579	1,05	1,14	1,21	0,035
HDLBP	Vigilin	Q00341	1,02	1,16	1,17	0,025
HSP90AA1	Heat shock protein HSP 90-alpha	P07900	1,11	1,09	1,17	0,05
ACO2	Aconitate hydratase, mitochondrial	Q99798	1,06	1,15	1,16	0,043

Gen Name	Protein Name	SwissProt- Zugangsnr	0,5h	4h	24h	1- ANOVA
TLN1	Talin-1	Q9Y490	1,04	1,13	1,15	0,0091
KLHL5	Kelch-like protein 5	Q96PQ7	1,04	1,12	1,07	0,0004
GANAB	Neutral alpha-glucosidase AB	Q14697	-1,01	1,21	1,06	0,0082
EZR	Ezrin	P15311	-1,17	-1,19	-1,06	0,0096
CPNE1	Copine-1	Q99829	-1,05	-1,13	-1,07	0,0097
GARS	Glycyl-tRNA synthetase	P41250	-1,18	-1,17	-1,14	0,05
EIF3A	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	Q14152	1,03	-1,16	-1,16	0,0093
XRCC5	X-ray repair cross-complementing protein 5	P13010	-1,16	-1,09	-1,16	0,045
SND1	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	Q7KZF4	-1,04	-1,07	-1,17	0,0071
GFM1	Elongation factor G, mitochondrial	Q96RP9	-1,1	-1,1	-1,19	0,032
IMMT	Mitochondrial inner membrane protein	Q16891	-1,09	-1,05	-1,2	0,05
STARD8	StAR-related lipid transfer protein 8	Q92502	-1,07	-1,18	-1,21	0,015
MSN	Moesin	P26038	-1,14	-1,03	-1,21	0,02
HK1	Hexokinase-1	P19367	-1,02	-1,03	-1,23	0,0073
PLCG2	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2	P16885	-1,06	-1,13	-1,24	0,0093
RDX	Radixin	P35241	1	-1,13	-1,26	0,03
EEF2	Elongation factor 2	P13639	-1,11	-1,21	-1,28	0,0093
RAD50	DNA repair protein RAD50	Q92878	-1,12	-1,12	-1,37	0,029
KARS	Lysyl-tRNA synthetase	Q15046	-1,07	-1,1	-1,5	0,0092
APEH	Acylamino-acid-releasing enzyme	P13798	-1,12	1,18	-1,66	0,021

Tabelle 3 H: Differenziell exprimierte Proteine der Zelllinie 4060 nach Bestrahlung mit 10 Gy. Die Tabelle zeigt die Regulationsfaktoren zu den drei Zeitpunkten nach Bestrahlung, sowie den Proteinnamen, den Gennamen und die Zugangsnummern der Proteine aus der Protein-Datenbank SwissProt.

Gen Name	Protein Name	SwissProt-Zugangsnr	0,5h	4h	24h	1-ANOVA
EHD1	EH domain-containing protein 1	Q9H4M9	-1,15	-1,08	1,3	0,04
RABGAP1L	Rab GTPase-activating protein 1-like	Q5R372	-1,03	1,17	1,24	0,002
PDIA6	Protein disulfide-isomerase A6	Q15084	1,33	1,08	1,23	0,041
MX1	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1	P20591	1,01	1,07	1,16	0,04
SFPQ	Splicing factor, proline-and glutamine-rich	P23246	1	1,11	1,15	0,03
PTPN1	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1	P18031	-1,01	1,05	1,12	0,05
HSPA5	78 kDa glucose-regulated protein	P11021	1	1,05	1,11	0,05
EEF2	Elongation factor 2	P13639	1	1,03	1,1	0,05
CORO1A	Coronin-1A	P31146	-1,03	1,28	1,09	0,043
UQCRC2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	P22695	1,15	1,02	1,02	0,05
H2AFV	Histone H2A.V	Q71UI9	1,11	1,21	1,01	0,03
NSFL1C	NSFL1 cofactor p47	Q9UNZ2	-1,25	-1,45	1	0,005
NDUFS1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	P28331	1,1	1,09	1	0,05
XRCC6	X-ray repair cross-complementing protein 6	P12956	-1,06	-1,12	1	0,043
FUBP1	Far upstream element-binding protein 1	Q96AE4	-1,11	-1,11	1	0,045
GANAB	Neutral alpha-glucosidase AB	Q14697	1,03	1,1	1	0,05
GOT2	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	P00505	-1,03	-1,12	1	0,045
HNRNPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	P61978	1,09	1,13	-1,02	0,022
UBA1	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	P22314	-1,08	-1,11	-1,07	0,05
RNPEP	Aminopeptidase B	Q9H4A4	-1,02	-1,1	-1,07	0,04
SDHA	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	P31040	1	-1,13	-1,1	0,04
C10orf88	Uncharacterized protein C10orf88	Q9H8K7	-1,04	-1,15	-1,11	0,036
PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	P62937	-1,03	-1,08	-1,11	0,04
HNRNPL	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	P14866	-1,04	-1,15	-1,13	0,04
ALDOC	Fructose-bisphosphate aldolase C	P09972	1,02	1,02	-1,16	0,02
TLN1	Talin-1	Q9Y490	1,02	1	-1,19	0,005
ALB	Serum albumin	P02768	1,12	-1,22	-1,27	0,012
MCM7	DNA replication licensing factor MCM7	P33993	-1,07	-1,09	-1,28	0,02

Gen Name	Protein Name	SwissProt-Zugangsnr	0,5h	4h	24h	1-ANOVA
ZC3HAV1	Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1	Q7Z2W4	1	-1,4	-1,35	0,004

Tabelle 3 I: Differenziell exprimierte Proteine der Zelllinie 20037 nach Bestrahlung mit 1 Gy. Die Tabelle zeigt die Regulationsfaktoren zu den drei Zeitpunkten nach Bestrahlung, sowie den Proteinennamen, den Gennamen und die Zugangsnummern der Proteine aus der Protein-Datenbank SwissProt.

Gen Name	Protein Name	SwissProt-Zugangsnr	0,5h	4h	24h	1-ANOVA
SERPINB9	Serpin B9	P50453	1,05	1,12	1,42	0,0098
HSPD1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	P10809	1	1,09	1,32	0,039
DPYSL2	Dihydropyrimidinase-related protein 2	Q16555	-1,07	-1,02	1,3	0,043
NARS	Asparaginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	O43776	-1,02	1,14	1,22	0,018
NCF2	Neutrophil cytosol factor 2	P19878	1,1	1,04	1,22	0,021
ACTR3	Actin-related protein 3	P61158	1,05	1,14	1,2	0,022
CCT3	T-complex protein 1 subunit gamma	P49368	1,05	1,02	1,19	0,05
WARS	Tryptophanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	P23381	1,01	1,02	1,19	0,032
HNRNPL	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	P14866	1	1,14	1,18	0,015
TCP1	T-complex protein 1 subunit alpha	P17987	1	1,07	1,17	0,029
CCT7	T-complex protein 1 subunit eta	Q99832	1,05	1,07	1,15	0,047
ALDOC	Fructose-bisphosphate aldolase C	P09972	1,1	1,05	1,11	0,037
VCP	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	P55072	1,1	1,08	1,08	0,025
UBA1	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	P22314	-1,02	-1,1	1	0,023
ALDH18A1	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	P54886	-1,12	-1,05	-1,01	0,047
LRPPRC	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	P42704	-1,17	-1,22	-1,08	0,05
PTPN6	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6	P29350	-1,17	-1,22	-1,08	0,05
WDR1	WD repeat-containing protein 1	O75083	1,03	-1,19	-1,11	0,019

Gen Name	Protein Name	SwissProt- Zugangsnr	0,5h	4h	24h	1 ANOVA
ERO1L	ERO1-like protein alpha	Q96HE7	-1,16	-1,23	-1,12	0,0032
TPI1	Triosephosphate isomerase	P60174	-1,07	-1,06	-1,15	0,035
CORO1A	Coronin-1A	P31146	-1,01	-1,14	-1,17	0,038
HNRNPH1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	P31943	-1,02	-1,04	-1,18	0,048
RUVBL1	RuvB-like 1	Q9Y265	-1,18	-1,11	-1,23	0,032
FKBP4	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4	Q02790	-1,23	-1,23	-1,26	0,04
PSMD13	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	Q9UNM6	-1,05	-1,12	-1,31	0,019

Tabelle 3 J: Differenziell exprimierte Proteine der Zelllinie 20037 nach Bestrahlung mit 10 Gy.
Die Tabelle zeigt die Regulationsfaktoren zu den drei Zeitpunkten nach Bestrahlung, sowie den Proteinennamen, den Gennamen und die Zugangsnummern der Proteine aus der Protein-Datenbank SwissProt.

Gen Name	Protein Name	SwissProt- Zugangsnr	0,5h	4h	24h	1- ANOVA
DARS	Aspartyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	P14868	1	1,03	1,75	0,05
TUBB	Tubulin beta chain	P07437	1,09	1,1	1,54	0,0049
PHB	Prohibitin	P35232	1,06	1,17	1,49	0,029
MTHFD1	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	P11586	1,08	1,12	1,48	0,047
C1QBP	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	Q07021	-1,03	1,07	1,39	0,041
PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3	P07237	1,05	1,04	1,3	0,0086
HK1	Hexokinase-1	P19367	1,16	1,11	1,27	0,0064
PAICS	Multifunctional protein ADE2	P22234	1,12	1,05	1,26	0,021
LDHB	L-lactate dehydrogenase B chain	P07195	1,03	1,02	1,24	0,038
RAN	GTP-binding nuclear protein Ran	P62826	1	1,14	1,24	0,027
SDHA	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	P31040	1,08	1,08	1,22	0,049
APEH	Acylamino-acid-releasing enzyme	P13798	1,06	-1,07	1,21	0,0087
EEF2	Elongation factor 2	P13639	1,04	1,05	1,21	0,05
PPP2CB	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform	P62714	1,04	1,04	1,2	0,049
HSP90B1	Endoplasmin	P14625	1,13	1,11	1,19	0,0092

Gen Name	Protein Name	SwissProt-Zugangsnr	0,5h	4h	24h	1-ANOVA
MX1	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1	P20591	-1,02	1,08	1,15	0,0041
PRDX4	Peroxiredoxin-4	Q13162	-1,04	-1,03	1,14	0,0097
UBA1	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	P22314	1,13	1,11	1,14	0,0087
WDR1	WD repeat-containing protein 1	O75083	1,08	1,05	1,12	0,045
ANXA4	Annexin A4	P09525	-1,03	-1,07	1,12	0,012
PDCD6IP	Programmed cell death 6-interacting protein	Q8WUM4	1,11	1,06	1,11	0,05
PREX1	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchanger 1 protein	Q8TCU6	-1,02	-1,39	1,05	1,017
ATIC	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	P31939	1,12	1,06	1,05	0,05
VCL	Vinculin	P18206	1,14	1,11	1,04	0,05
EIF3A	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	Q14152	1,13	1,17	1	0,031
ANXA11	Annexin A11	P50995	1	-1,24	-1,01	0,025
VCP	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	P55072	-1,02	-1,1	-1,03	0,011
MSN	Moesin	P26038	-1,03	-1,13	-1,09	0,013
TUBA1B	Tubulin alpha-1B chain	P68363	1,13	1,19	-1,13	0,036
SND1	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	Q7KZF4	1,01	1,17	-1,13	0,029
TCP1	T-complex protein 1 subunit alpha	P17987	1,13	-1,11	-1,13	0,019
HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein	P11142	1,02	-1,04	-1,14	0,0087
NARS	Asparaginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	O43776	-1,1	-1,06	-1,14	0,017
PFKP	6-phosphofructokinase type C	Q01813	-1,01	-1,1	-1,15	0,018
RPSA	40S ribosomal protein SA	P08865	-1,03	-1,04	-1,15	0,0087
P4HB	Protein disulfide-isomerase	Q0279	-1,1	-1,16	-1,17	0,014
EIF4A2	Eukaryotic initiation factor 4A-II	Q14240	-1,02	-1,03	-1,17	0,043
ACADM	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	P11310	-1,05	-1,07	-1,17	0,0061
YWHAZ	14-3-3 protein zeta/delta	P63104	-1,03	-1,05	-1,18	0,021
STOML2	Stomatin-like protein 2	Q9UJZ1	1	-1,05	-1,19	0,0057
HNRNPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	P61978	-1,24	-1,28	-1,3	0,0086
EZR	Ezrin	P15311	-1,09	-1,31	-1,34	0,041
ENO1	Alpha-enolase	P06733	-1,18	-1,16	-1,39	0,0096
HNRNPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	P61978	-1,24	-1,28	-1,6	0,0086
EIF3F	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	O00303	-1,78	-1,58	-2,03	0,031

Abbildung 2: Berechnung des p-Werts durch den einseitigen exakten Fisher-Test in der Software Ingenuity Pathway Analysis (IPA): Es wird eine 2x2 Kontingenztafel, basierend auf der Gesamtzahl, des Beispiels und der Anzahl der Moleküle, die sich klassifizieren lassen erstellt.

	Focus molecules	Non-Focus molecules	Row totals
Molecules associated with a function	n_{11}	n_{12}	row_1
Molecules not associated with a that function	n_{21}	n_{22}	row_2
Column totals	col_1	col_2	N

$$P = (row_1! \cdot row_2! \cdot col_1! \cdot col_2!) / (N! \cdot n_{11}! \cdot n_{12}! \cdot n_{21}! \cdot n_{22}!)$$

Tabelle 4: Proteine und ihre zellulären Funktionen nach Ingenuity-Analyse

Funktion	Bezeichnung Ingenuity	Definition
Aufrechterhaltung der Zell-Funktion	<i>Cellular Function and Maintenance</i>	Funktionen, die mit normalen Zellfunktionen assoziiert sind und zelluläre Homöostase aufrechterhalten. Beispiele: Phagozytose, Regulation, Stase der Zellen
DNA-Replikation, -Reparatur und -Rekombination	<i>DNA Replication, Recombination and Repair</i>	Funktionen, die mit DNA-Rekombination, -Replikation und -Reparatur assoziiert sind. Beispiele: Bildung der Replikationsgabel, homologe Rekombination und DNA-Schaden
Energie-Produktion	<i>Energy Production</i>	Funktionen, die mit der Energie-Produktion der Zelle assoziiert sind. Beispiel: Produktion und Hydrolyse von Adenosintriphosphat.
Genexpression	<i>Gene Expression</i>	Funktionen, die mit Genexpression assoziiert sind. Beispiele: Chromatin-Acetylierung, Gen-Transkription und mRNA-Elongation
Kohlehydrat-Metabolismus	<i>Carbohydrate Metabolism</i>	Funktionen, die mit dem Kohlehydrat-Metabolismus assoziiert sind. Beispiele: Glykogen-Aktivierung und Kohlenhydrat-Verbrauch
Lipid-Metabolismus	<i>Lipid Metabolism</i>	Funktionen, die mit dem Fettsäuremetabolismus assoziiert sind. Beispiele: Absorption von Cholesterol und Adipositas
Molekül-Transport	<i>Molecular Transport</i>	Funktionen, die mit der intra-und extrazellulären Bewegung von Molekülen assoziiert sind, wie Transport von: kleinen Molekülen, Ionen, DNA, RNA, Proteinen, Lipiden und Kohlenhydraten Beispiele: Glutamat-Efflux und DNA-Verarmung

Funktion	Bezeichnung Ingenuity	Definition
Niedermolekulare Biochemie	<i>Small Molecule Biochemistry</i>	Funktionen, die mit kleinen Molekülen assoziiert sind. Beispiele: Generierung von Stickstoffmonoxid und Indol-Metabolismus
Nukleinsäure-Metabolismus	<i>Nucleic Acid Metabolism</i>	Funktionen, die mit dem Nukleinsäure-Metabolismus assoziiert sind. Beispiele: Bildung von Guanosin-Triphosphat und Thymidin-Exkretion
Post-translationale Modifikation	<i>Post-translational Modification</i>	Funktionen, die mit der Modifizierung von Proteinen nach der Translation assoziiert sind. Beispiele: Lysin-Methylierung, Protein-Spaltung und -Phosphorylierung
Protein-Degradation	<i>Protein Degradation</i>	Funktionen, die mit Schaden und Protein-Zerstörung assoziiert sind. Beispiele: Hydrolyse und Oxidierung von Proteinen
Protein-Faltung	<i>Protein Folding</i>	Funktionen, die mit Konformationsänderungen von proteinen assoziiert sind. Beispiele: Konjugation und Denaturierung von Proteinen
Protein-Synthese	<i>Protein Synthesis</i>	Funktionen, die mit der Bildung von Proteinen assoziiert sind. Beispiele: mRNA-Translation, Aufnahme von Aminosäuren und Protein-Formation
Protein-Transport	<i>Protein Trafficking</i>	Funktionen, die mit der Bewegung von Proteinen innerhalb eines Systems assoziiert sind. Beispiele: Protein-Import, Eliminierung und Protein-Verteilung
Radikal-Fänger	<i>Free Radical Scavenging</i>	Funktionen, die mit dem Einfang von freien Radikalen oder anderen reaktiven Sauerstoffmolekülen assoziiert sind. Beispiele: Entfernen von Superoxid Radikalen und Produktion von reaktiven Sauerstoff-Spezies
RNA Post-translationale Modifikation	<i>RNA Post-transcriptional Modification</i>	Post-transkriptionale Prozessierung der RNA vor der translation- Beispiele: Spaltung, Prozessierung und Entwinden der RNA
Schadensantwort	<i>Cellular Compromise</i>	Funktionen, die mit Schaden oder Degeneration der Zellen, oder mit Prozessen die die Funktion der Zelle kompromittieren assoziiert sind. Beispiele: Atrophie, Schaden, Zersetzung und Schwellen der Zellen
Zellaufbau und Organistaion	<i>Cellular Assembly and Organization</i>	Funktionen die mit subzellulären Komponenten assoziiert sind, die an der Organisation und Anordnung der zellulären Strukturen involviert sind. Beispiele: Anordnung von Aktin-Filamenten und Aggregation von Liposomen

Funktion	Bezeichnung	Definition
Zelluläre Bewegung	<i>Cellular Movement</i>	Funktionen, die mit der Bewegung und Lokalisation der Zellen assoziiert sind. Beispiele: Chemotaxis, Infiltrierung, Neuordnung und Transmigration der Zellen
Zelluläre Entwicklung	<i>Cellular Development</i>	Funktionen, die mit der Entwicklung und Differenzierung der Zellen assoziiert sind. Beispiele: Myogenese und Hematopoese der Zellen, Zellreifung und Seneszenz
Zell-Morphologie	<i>Cell Morphology</i>	Funktionen, die mit der Morphologie der zelle assoziiert sind. Beispiele: Vergrößerung, Fluidität, Größe, Transformation der Zelle und Remodellierung des Zytoskeletts
Zell-Proliferation	<i>Cellular Growth and Proliferation</i>	Funktionen, die mit dem Wachstum und der Proliferation der Zellen assoziiert sind. Beispiele: Koloniebildung, Proliferation, Auswuchs der Zellen
Zell-Signalgebung	<i>Cell Signaling</i>	Funktionen, die an intrazellulären Signalwegen beteiligt sind. Beispiele: Signalmoleküle wie zyklisches AMP, Stickoxid und Kalzium, sowie Signal-Funktionen, wie die Phosphorylierung von Tyrosin und der Guanin-Nukleotid-Austausch
Zelltod	<i>Cell Death</i>	Funktionen die mit dem eintretenden Zelltod assoziiert sind Beispiele: Apoptose
Zell/Zell-Signalgebung und Interaktion	<i>Cell-to-Cell Signaling and Interaction</i>	Funktionen, die an interzellularen Interaktionen beteiligt sind, sowie Funktionen, die mit spezifischen zellulären Komponenten der Signalgebung und Interaktion assoziiert sind. Beispiele: Bindung, Anheftung, Kommunikation, Pheromon-Antwort und Stimulierung, sowie interzelluläre Anbindung und Zellsubstrat-Kontakt

Tabelle 5 A-J: Proteine, die den zellulären Funktionen aus Ingenuity zugeordnet werden können.

Tabelle 5 A_1: Proteine und ihre zellulären Funktionen in der Linie HuKo 4 h nach Bestrahlung mit 1 Gy

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cellular Function and Maintenance	mitochondrial membrane potential	2,33E-05	NDUFS1,PRDX3
Cellular Function and Maintenance	reorganization of actin stress fibers	2,88E-03	LCP1
Cellular Function and Maintenance	organization of mitochondria	5,76E-03	PRDX3
Cellular Function and Maintenance	cellular homeostasis	6,79E-03	NDUFS1,PPIA,PRDX3
Cellular Function and Maintenance	depolarization of mitochondrial membrane	1,03E-02	PPIA
Cellular Function and Maintenance	Clathrin mediated endocytosis	2,74E-02	ATP6V1B2
Cellular Function and Maintenance	engulfment by cervical cancer cell lines	2,96E-02	ATP6V1B2
Cellular Function and Maintenance	endocytosis by tumor cell lines	3,13E-02	ATP6V1B2
Cellular Function and Maintenance	formation of lamellipodia	3,30E-02	LCP1
Free Radical Scavenging	metabolism of reactive oxygen species	1,05E-05	HNRNPK,NDUFS1,PPIA,PRDX3
Free Radical Scavenging	synthesis of reactive oxygen species	3,31E-04	HNRNPK,NDUFS1,PPIA
Free Radical Scavenging	accumulation of superoxide	5,77E-04	NDUFS1
Free Radical Scavenging	accumulation of hydrogen peroxide	1,73E-03	NDUFS1
Free Radical Scavenging	production of reactive oxygen species	4,78E-03	HNRNPK,NDUFS1
Free Radical Scavenging	catabolism of hydrogen peroxide	7,48E-03	PRDX3
Cell Morphology	mitochondrial membrane potential	2,33E-05	NDUFS1,PRDX3

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cell Morphology	structural integrity of plasma membrane	1,73E-03	NDUFS1
Cell Morphology	polarization of peripheral T lymphocyte	2,31E-03	LCP1
Cell Morphology	morphology of cells	2,32E-03	ATP6V1B2,LCP1,NDUFS1
Cell Morphology	reorganization of actin stress fibers	2,88E-03	LCP1
Cell Morphology	mass of mitochondria	4,04E-03	PRDX3
Cell Morphology	morphology of mitochondria	1,32E-02	NDUFS1
Cell Morphology	formation of lamellipodia	3,30E-02	LCP1
Cell Morphology	morphology of clathrin-coated structures	3,91E-02	ATP6V1B2
Cellular Movement	chemotaxis of peripheral blood leukocytes	4,57E-05	LCP1,PPIA
Cellular Movement	chemotaxis of lymphocytes	8,80E-04	LCP1,PPIA
Cellular Movement	chemotaxis of peripheral T lymphocyte	1,15E-03	LCP1
Cellular Movement	migration of peripheral T lymphocyte	4,61E-03	LCP1
Cellular Movement	chemotaxis of peripheral blood monocytes	6,91E-03	PPIA
Cellular Movement	cell movement of tumor cell lines	1,13E-02	HNRNPK,LCP1,PPIA
Cellular Movement	chemotaxis of embryonic cell lines	1,32E-02	PPIA
Cellular Movement	chemotaxis of epithelial cell lines	1,32E-02	PPIA
Cellular Movement	chemotaxis of kidney cell lines	1,49E-02	PPIA
Cellular Movement	migration of fibrosarcoma cell lines	1,83E-02	HNRNPK
Cellular Movement	migration of cells	2,96E-02	HNRNPK,LCP1,PPIA

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cellular Movement	chemotaxis of leukemia cell lines	3,47E-02	PPIA
Cellular Movement	invasion of prostate cancer cell lines	4,41E-02	LCP1
Molecular Transport	transport of H ⁺	6,27E-05	ATP5B,ATP6V1B2
Molecular Transport	accumulation of superoxide	5,77E-04	NDUFS1
Molecular Transport	accumulation of hydrogen peroxide	1,73E-03	NDUFS1
Molecular Transport	concentration of glutathione	8,06E-03	NDUFS1
Molecular Transport	concentration of ATP	2,17E-02	NDUFS1

Tabelle 5 A_2: Proteine und ihre zellulären Funktionen in der Linie HuKo 24 h nach Bestrahlung mit 1 Gy

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Amino Acid Metabolism	auto-oxidation of homocysteine	6,93E-04	ALB
Amino Acid Metabolism	efflux of L-triiodothyronine	2,77E-03	ALB
Amino Acid Metabolism	efflux of levothyroxine	2,77E-03	ALB
Cellular Compromise	degranulation of BMMC cells	6,93E-04	ALB
Cellular Compromise	respiratory burst	2,47E-02	PGAM1
Drug Metabolism	binding of ketoprofen	6,93E-04	ALB
Drug Metabolism	quantity of midazolam	6,93E-04	ALB
Drug Metabolism	efflux of levothyroxine	2,77E-03	ALB
Drug Metabolism	hydroxylation of midazolam	2,77E-03	ALB
Drug Metabolism	metabolism of terfenadine	2,77E-03	ALB
Drug Metabolism	binding of progesterone	4,15E-03	HSP90AB1
Drug Metabolism	concentration of glutathione	9,66E-03	NDUFS1

Free Radical Scavenging	synthesis of reactive oxygen species	1,92E-05	ALB,HNRNPK,IMMT,N DUFS1
Free Radical Scavenging	production of reactive oxygen species	2,42E-04	HNRNPK,IMMT,NDUF S1
Free Radical Scavenging	accumulation of superoxide	6,93E-04	NDUFS1
Free Radical Scavenging	accumulation of hydrogen peroxide	2,08E-03	NDUFS1
RNA Post-Transcriptional Modification	processing of RNA	5,02E-04	ALB,HNRNPH1,HNRN PK
RNA Post-Transcriptional Modification	polyadenylation of mRNA	8,97E-03	ALB
RNA Post-Transcriptional Modification	splicing of primary transcript RNA	1,24E-02	HNRNPH1

Tabelle 5 A_3: Proteine und ihre zellulären Funktionen in der Linie HuKo 24 h nach Bestrahlung mit 1 Gy

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cellular Assembly and Organization	linkage of actin cytoskeleton	3,85E-09	EZR,MSN,RDX
Cellular Assembly and Organization	microtubule dynamics	5,00E-05	EZR,HSP90AA1,MSN, MYH9,PLCG2,RDX,TL N1
Cellular Assembly and Organization	reorganization of cytoskeleton	9,61E-05	EZR,MSN,MYH9,RDX
Cellular Compromise	retraction of lamellipodia	2,55E-06	MSN,RDX
Cellular Compromise	retraction of cellular protrusions	1,96E-04	MSN,MYH9,RDX
Cellular Compromise	degeneration of stereocilia	1,63E-03	RDX
Cellular Function and Maintenance	quantity of radial cellular projections	2,55E-06	MSN,RDX
Cellular Function and Maintenance	microtubule dynamics	5,00E-05	EZR,HSP90AA1,MSN, MYH9,PLCG2,RDX,TL N1
Cellular Function and Maintenance	reorganization of cytoskeleton	9,61E-05	EZR,MSN,MYH9,RDX
Drug Metabolism	efflux of vinblastine	7,65E-06	MSN,RDX
Molecular Transport	efflux of vinblastine	7,65E-06	MSN,RDX
Molecular Transport	accumulation of phosphatidylinositol 3,4-diphosphate	1,13E-02	MYH9
Molecular Transport	transport of mitochondrial membrane	1,78E-02	HSP90AA1

Tabelle 5 B_1: Proteine und ihre zellulären Funktionen in der Linie HuKo 0,5 h nach Bestrahlung mit 10 Gy

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cell Death and Survival	apoptosis of intestinal cell lines	5,20E-04	HSPD1
Cell Death and Survival	cell viability of nervous tissue cell lines	1,56E-03	LDHA
Cell Death and Survival	apoptosis of skin cell lines	2,60E-03	HSPD1
Cell Death and Survival	cell viability of monocyte-derived dendritic cells	6,22E-03	MX1
Cell Death and Survival	cell death of epithelial cell lines	7,37E-03	HSPD1,LDHA
Cell Death and Survival	activation of caspase	2,62E-02	HSPD1
Cell Death and Survival	apoptosis of fibroblast cell lines	2,92E-02	HSPD1
Cell Death and Survival	apoptosis of vascular endothelial cells	3,38E-02	HSPD1
Cell Morphology	morphology of stomach cancer cell lines	5,20E-04	CSK
Cell Morphology	polarity of T lymphocytes	1,04E-03	HSPD1
Cell Morphology	transmembrane potential of mitochondria	2,41E-03	HSPD1,LDHA
Cell Morphology	morphology of cervical cancer cell lines	9,83E-03	CSK
Cellular Development	maturation of bone marrow-derived dendritic cells	5,20E-04	HSPD1
Cellular Development	proliferation of vascular smooth muscle cells	2,57E-02	HSPD1
Cellular Development	proliferation of B lymphocytes	2,97E-02	HSPD1
Cellular Development	proliferation of lymphoblastoid cell lines	3,18E-02	LDHA
Protein Folding	folding of protein	3,26E-04	HSPD1,PDIA6
Protein Folding	refolding of protein	4,67E-03	HSPD1
Post-Translational Modification	folding of protein	3,26E-04	HSPD1,PDIA6
Post-Translational Modification	refolding of protein	4,67E-03	HSPD1

Tabelle 5 B_2: Proteine und ihre zellulären Funktionen in der Linie HuKo 4 h nach Bestrahlung mit 10 Gy

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cell Death and Survival	apoptosis of intestinal cell lines	8,08E-04	HSPD1
Cell Death and Survival	colony survival of endometrial cancer cell lines	8,08E-04	MSH2
Cell Death and Survival	cytolysis of lymphoblastoid cells	8,08E-04	MSH2
Cell Death and Survival	cell viability of nervous tissue cell lines	2,42E-03	LDHA
Cell Death and Survival	cytolysis of cervical cancer cell lines	2,42E-03	MSH2
Cell Death and Survival	apoptosis of skin cell lines	4,04E-03	HSPD1
Cell Death and Survival	cell death of epithelial cell lines	1,77E-02	HSPD1,LDHA
Cell Death and Survival	cell death of breast cancer cell lines	3,19E-02	HSPD1,MSH2
Cell Death and Survival	activation of caspase	4,05E-02	HSPD1
Cell Death and Survival	apoptosis of fibroblast cell lines	4,51E-02	HSPD1
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	cytotoxic reaction of endometrial cancer cell lines	8,08E-04	MSH2
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	activation of PBMCs	6,45E-03	HSPD1
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	activation of B lymphocytes	1,61E-02	HSPD1
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	activation of macrophages	2,00E-02	HSPD1
Cellular Development	maturation of bone marrow-derived dendritic cells	8,08E-04	HSPD1
Cellular Development	proliferation of lymphocytes	8,65E-04	HSPD1,IMPDH2,MSH2
Cellular Development	polarization of neurons	1,62E-03	DPYSL2
Cellular Development	proliferation of V-delta-2 gamma-delta T cells	3,23E-03	MSH2
Cellular Development	proliferation of T lymphocytes	9,79E-03	HSPD1,MSH2
Cellular Development	proliferation of vascular smooth muscle cells	3,97E-02	HSPD1
Cellular Development	proliferation of B lymphocytes	4,59E-02	HSPD1
Cellular Development	proliferation of lymphoblastoid cell lines	4,90E-02	LDHA
Cellular Function and Maintenance	colony survival of endometrial cancer cell lines	8,08E-04	MSH2
Cellular Function and Maintenance	polarization of neurons	1,62E-03	DPYSL2

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cellular Function and Maintenance	reorganization of actin stress fibers	4,04E-03	LCP1
Cellular Function and Maintenance	transmembrane potential of mitochondria	5,93E-03	HSPD1,LDHA
Cellular Function and Maintenance	function of regulatory T lymphocytes	6,45E-03	HSPD1
Cellular Function and Maintenance	formation of cellular protrusions	1,52E-02	DPYSL2,LCP1
Cellular Function and Maintenance	formation of microtubules	2,00E-02	DPYSL2
Cellular Function and Maintenance	formation of lamellipodia	4,59E-02	LCP1
Cellular Function and Maintenance	endoplasmic reticulum stress response	4,98E-02	HSPD1
Cellular Movement	T cell migration	5,57E-05	DPYSL2,HSPD1,LCP1
Cellular Movement	chemotaxis of peripheral T lymphocyte	1,62E-03	LCP1
Cellular Movement	migration of peripheral T lymphocyte	6,45E-03	LCP1

Tabelle 5 B_3: Proteine und ihre zellulären Funktionen in der Linie HuKo 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cell Death and Survival	apoptosis of intestinal cell lines	8,66E-04	HSPD1
Cell Death and Survival	apoptosis of skin cell lines	4,32E-03	HSPD1
Cell Death and Survival	cell viability of monocyte-derived dendritic cells	1,03E-02	MX1
Cell Death and Survival	activation of caspase	4,33E-02	HSPD1
Cell Death and Survival	apoptosis of fibroblast cell lines	4,83E-02	HSPD1
Cell Morphology	morphology of stomach cancer cell lines	8,66E-04	CSK
Cell Morphology	formation of lamellipodia	1,13E-03	CAP1,LCP1
Cell Morphology	polarity of T lymphocytes	1,73E-03	HSPD1
Cell Morphology	elongation of actin filaments	2,60E-03	CAP1
Cell Morphology	polarization of peripheral T lymphocyte	3,46E-03	LCP1
Cell Morphology	reorganization of actin stress fibers	4,32E-03	LCP1
Cell Morphology	size of cervical cancer cell lines	4,32E-03	CAP1
Cell Morphology	morphology of cells	7,90E-03	CAP1,CSK,LCP1

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cell Morphology	cell spreading of cervical cancer cell lines	1,46E-02	CAP1
Cell Morphology	morphology of cervical cancer cell lines	1,63E-02	CSK
Cell Morphology	cell polarity formation	2,06E-02	CAP1
Cellular Development	maturation of bone marrow-derived dendritic cells	8,66E-04	HSPD1
Cellular Development	proliferation of prostate cancer cell lines	2,32E-02	LCP1,PA2G4
Cellular Development	proliferation of vascular smooth muscle cells	4,25E-02	HSPD1
Cellular Development	proliferation of B lymphocytes	4,91E-02	HSPD1
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of cells	2,63E-04	ACTB,CSK,DDB1,DLD,HSPD1,LCP1,MX1,PA2G4,PFKP
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of connective tissue cells	1,24E-02	CSK,PA2G4
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of synovial cells	2,06E-02	CSK
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of prostate cancer cell lines	2,32E-02	LCP1,PA2G4
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of vascular smooth muscle cells	4,25E-02	HSPD1
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of B lymphocytes	4,91E-02	HSPD1
Cellular Movement	invasion of prostate cancer cell lines	3,85E-05	LCP1,MX1,PA2G4
Cellular Movement	cell movement of prostate cancer cell lines	1,02E-04	LCP1,MX1,PA2G4
Cellular Movement	invasion of tumor cell lines	1,47E-04	CAP1,CSK,LCP1,MX1,PA2G4
Cellular Movement	cell movement of tumor cell lines	5,97E-04	CAP1,CSK,LCP1,MX1,PA2G4
Cellular Movement	cell movement	7,02E-04	CAP1,CSK,HSPD1,LCP1,MX1,PA2G4
Cellular Movement	chemotaxis of peripheral T lymphocyte	1,73E-03	LCP1
Cellular Movement	elongation of actin filaments	2,60E-03	CAP1
Cellular Movement	T cell migration	2,98E-03	HSPD1,LCP1
Cellular Movement	leukocyte migration	3,42E-03	HSPD1,LCP1,PA2G4
Cellular Movement	scattering of colon cancer cell lines	3,46E-03	CSK
Cellular Movement	migration of peripheral T lymphocyte	6,91E-03	LCP1
Cellular Movement	migration of cells	1,86E-02	CSK,HSPD1,LCP1,PA2G4

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cellular Movement	cell movement of leukocyte cell lines	3,24E-02	PA2G4
Cellular Movement	chemotaxis of cells	3,28E-02	CSK,LCP1

Tabelle 5 C_1: Proteine und ihre zellulären Funktionen in der Linie GM03323(+) 4 h nach Bestrahlung mit 1 Gy

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Amino Acid Metabolism	auto-oxidation of homocysteine	5,20E-04	ALB
Amino Acid Metabolism	efflux of L-triiodothyronine	2,08E-03	ALB
Amino Acid Metabolism	efflux of levothyroxine	2,08E-03	ALB
Cellular Compromise	degranulation of BMMC cells	5,20E-04	ALB
Cellular Compromise	oxidative stress response of heart cell lines	5,20E-04	NAMPT
Cellular Development	lifespan of heart cell lines	5,20E-04	NAMPT
Cellular Development	lifespan of smooth muscle cells	1,04E-03	NAMPT
Cellular Development	differentiation of cells	5,50E-03	ALB,ENO1,UBE2I
Cellular Development	differentiation of muscle precursor cells	1,03E-02	ALB
Cellular Development	proliferation of stomach cancer cell lines	2,42E-02	XRCC6
Cellular Development	differentiation of stem cells	3,33E-02	ALB
Cellular Development	proliferation of endothelial cell lines	3,83E-02	UBE2I
Carbohydrate Metabolism	conversion of isocitric acid	5,20E-04	ACO1
RNA Post-Transcriptional Modification	polyadenylation of RNA	3,66E-05	ALB,UBE2I
RNA Post-Transcriptional Modification	binding of mRNA	1,04E-03	ACO1
RNA Post-Transcriptional Modification	cleavage of hnRNA	1,04E-03	UBE2I
RNA Post-Transcriptional Modification	polyadenylation of hnRNA	1,04E-03	UBE2I
RNA Post-Transcriptional Modification	processing of RNA	6,25E-03	ALB,HNRNPH1
RNA Post-Transcriptional Modification	polyadenylation of mRNA	6,74E-03	ALB
RNA Post-Transcriptional Modification	splicing of primary transcript RNA	9,32E-03	HNRNPH1

Tabelle 5 C_2: Proteine und ihre zellulären Funktionen in der Linie GM03323(+) 24 h nach Bestrahlung mit 1 Gy

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	antiviral response of fibroblasts	4,04E-04	STAT1
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	conjugation of T lymphocytes	8,08E-04	EZR
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	sensitization of macrophages	8,08E-04	STAT1
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	conjugation of lymphoma cell lines	1,62E-03	EZR
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	contact growth inhibition of melanoma cell lines	2,02E-03	STAT1
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	adhesion of T lymphocytes	1,84E-02	EZR
Lipid Metabolism	tubulation of lipid	4,04E-04	MX1
Small Molecule Biochemistry	tubulation of lipid	4,04E-04	MX1
Cell Cycle	antiproliferative response of fibroblasts	4,04E-04	STAT1
Cell Cycle	delay in G0/G1 phase transition of leukemia cell lines	8,08E-04	STAT1
Cell Cycle	contact growth inhibition of melanoma cell lines	2,02E-03	STAT1
Cell Cycle	replication of cells	1,09E-02	STAT1
Cell Cycle	arrest in G0/G1 phase transition	1,41E-02	STAT1
Cellular Growth and Proliferation	antiproliferative response of fibroblasts	4,04E-04	STAT1
Cellular Growth and Proliferation	cytostasis of rhabdomyosarcoma cell lines	8,08E-04	STAT1
Cellular Growth and Proliferation	arrest in growth of fibrosarcoma cell lines	1,21E-03	STAT1
Cellular Growth and Proliferation	colony formation of glioma cells	2,02E-03	EZR
Cellular Growth and Proliferation	contact growth inhibition of melanoma cell lines	2,02E-03	STAT1
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of cells	2,44E-03	ACTG1,ENO1,EZR, MX1,STAT1
Cellular Growth and Proliferation	arrest in growth of lymphoma cell lines	2,83E-03	STAT1
Cellular Growth and Proliferation	colony formation of leukemia cell lines	8,46E-03	ENO1
Cellular Growth and Proliferation	colony formation of cells	9,00E-03	ENO1,EZR
Cellular Growth and Proliferation	cytostasis of colon cancer cell lines	9,66E-03	STAT1

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of squamous cell carcinoma cell lines	2,91E-02	EZR

Tabelle 5 D_1: Proteine und ihre zellulären Funktionen in der Linie GM03323(+) 4 h nach Bestrahlung mit 10 Gy

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cell Cycle	delay in initiation of cytokinesis of cervical cancer cell lines	6,93E-04	LMNA
Cell Cycle	segregation of chromosomes	2,37E-02	LMNA
Cell Morphology	binucleation of fibroblasts	6,93E-04	LMNA
Cell Morphology	morphology of nucleus	5,19E-03	LMNA
Cellular Assembly and Organization	reassembly of GW body	3,46E-04	LMNA
Cellular Assembly and Organization	quantity of cytoplasmic aggregates	2,08E-03	LMNA
Cellular Assembly and Organization	morphology of nucleus	5,19E-03	LMNA
Cellular Assembly and Organization	segregation of chromosomes	2,37E-02	LMNA
Cellular Compromise	binucleation of fibroblasts	6,93E-04	LMNA

Tabelle 5 D_2: Proteine und ihre zellulären Funktionen in der Linie GM03323(+) 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Amino Acid Metabolism	hydroxylation of L-proline	1,39E-03	P4HB
Cell Cycle	entry into S phase of liver cell lines	1,39E-03	MCM7
Cell Cycle	exit from M phase of cervical cancer cell lines	1,39E-03	MCM7
Cell Cycle	S phase checkpoint control of carcinoma cell lines	2,77E-03	MCM7
Cell Cycle	S phase checkpoint control of lung cancer cell lines	2,77E-03	MCM7
Cell Cycle	entry into S phase of cervical cancer cell lines	9,66E-03	MCM7
Cell Cycle	contact growth inhibition of leukemia cell lines	1,38E-02	PRKAR1A
Cellular Compromise	endoplasmic reticulum stress response of leukemia cell lines	5,52E-06	HSP90B1,HSPA5
Cellular Compromise	endoplasmic reticulum stress response of hepatoma cell lines	3,85E-05	HSP90B1,HSPA5

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cellular Compromise	endoplasmic reticulum stress response of cervical cancer cell lines	8,23E-05	HSP90B1,HSPA5
Cellular Compromise	permeability transition of mitochondria	1,10E-02	HSPA5
Cellular Function and Maintenance	endoplasmic reticulum stress response of leukemia cell lines	5,52E-06	HSP90B1,HSPA5
Cellular Function and Maintenance	endoplasmic reticulum stress response of hepatoma cell lines	3,85E-05	HSP90B1,HSPA5
Cellular Function and Maintenance	endoplasmic reticulum stress response of cervical cancer cell lines	8,23E-05	HSP90B1,HSPA5
Cellular Function and Maintenance	aerobic respiration of cells	1,38E-02	UQCRC1
Cellular Function and Maintenance	autophagy of breast cancer cell lines	2,47E-02	HSPA5
Lipid Metabolism	tubulation of lipid	1,39E-03	MX1

Tabelle 5 E_1: Proteine und ihre zellulären Funktionen in der Linie GM03189(-) 4 h nach Bestrahlung mit 1 Gy

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Amino Acid Metabolism	auto-oxidation of homocysteine	5,77E-04	ALB
Amino Acid Metabolism	efflux of L-triiodothyronine	2,31E-03	ALB
Amino Acid Metabolism	efflux of levothyroxine	2,31E-03	ALB
Cell Cycle	senescence of dermal fibroblasts	5,77E-04	LMNB1
Cell Cycle	G1/S phase transition of T lymphocytes	1,73E-03	VIP
Cell Cycle	arrest in cell cycle progression of T lymphocytes	1,73E-03	VIP
Cellular Development	proliferation of dermal cells	5,57E-04	LMNB1,VIP
Cellular Development	senescence of dermal fibroblasts	5,77E-04	LMNB1
Cellular Development	proliferation of dermal fibroblasts	5,19E-03	LMNB1
Cellular Development	differentiation of muscle precursor cells	1,15E-02	ALB
Cellular Development	proliferation of skin cancer cell lines	1,55E-02	VIP
Cellular Development	proliferation of keratinocytes	2,85E-02	VIP
Cellular Development	differentiation of stem cells	3,69E-02	ALB
Cellular Development	proliferation of squamous cell carcinoma cell lines	4,14E-02	VIP
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of dermal cells	5,57E-04	LMNB1,VIP

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cellular Growth and Proliferation	induction of lymphoma cell lines	1,73E-03	VIP
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of dermal fibroblasts	5,19E-03	LMNB1
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of connective tissue cells	5,51E-03	LMNB1,VIP
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of skin cancer cell lines	1,55E-02	VIP
Cellular Growth and Proliferation	colony formation of carcinoma cell lines	1,78E-02	VIP
Cellular Growth and Proliferation	colony formation of lung cancer cell lines	2,00E-02	VIP
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of keratinocytes	2,85E-02	VIP
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of squamous cell carcinoma cell lines	4,14E-02	VIP
Cellular Assembly and Organization	stabilization of microfilaments	5,77E-04	MAP2
Cellular Assembly and Organization	formation of membrane processes	1,73E-03	MAP2
Cellular Assembly and Organization	structural integrity of plasma membrane	1,73E-03	NDUFS1
Cellular Assembly and Organization	formation of membrane blebs	2,88E-03	MAP2
Cellular Assembly and Organization	quantity of caveolae	4,04E-03	ALB
Cellular Assembly and Organization	formation of membrane ruffles	1,03E-02	MAP2
Cellular Assembly and Organization	formation of nucleus	1,03E-02	LMNB1
Cellular Assembly and Organization	length of telomeres	1,03E-02	GAPDH
Cellular Assembly and Organization	morphology of mitochondria	1,32E-02	NDUFS1
Cellular Assembly and Organization	stabilization of microtubules	3,19E-02	MAP2
Cellular Assembly and Organization	formation of lamellipodia	3,30E-02	MAP2

Tabelle 5 E_2: Proteine und ihre zellulären Funktionen in der Linie GM03189(-) 24 h nach Bestrahlung mit 1 Gy

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cell Death and Survival	apoptosis of lymphoma cell lines	7,41E-04	ALB,ARHGDIA,LMNB1
Cell Death and Survival	caspase-independent cell death of tumor cell lines	2,42E-03	GAPDH
Cell Death and Survival	cell death of tumor cell lines	3,11E-03	ALB,ARHGDIA,ENO1,GAPDH,LMNB1,PFKB1,PHB
Cell Death and Survival	killing of Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium	3,63E-03	ALB
Cell Death and Survival	apoptosis of tumor cell lines	3,85E-03	ALB,ARHGDIA,ENO1,GAPDH,LMNB1,PHB
Cell Death and Survival	apoptosis	7,30E-03	ALB,ARHGDIA,ENO1,GAPDH,LMNB1,NDUFS1,PHB
Cell Death and Survival	cell death	7,82E-03	ALB,ARHGDIA,ENO1,GAPDH,LMNB1,NDUFS1,PFKFB1,PHB
Cell Death and Survival	apoptosis of cancer cells	1,13E-02	ALB,ENO1
Cell Death and Survival	myocardial necrosis	1,45E-02	ALB
Cell Death and Survival	hemolysis	1,57E-02	ALB
Cell Death and Survival	apoptosis of carcinoma cells	2,04E-02	ENO1
Cell Death and Survival	apoptosis of thyroid tumor cell lines	2,40E-02	GAPDH
Cell Death and Survival	apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells	2,75E-02	ALB
Cell Death and Survival	cell death of carcinoma cell lines	2,90E-02	GAPDH,PFKFB1
Cell Death and Survival	apoptosis of keratinocyte cancer cell lines	3,34E-02	PHB
Cell Death and Survival	apoptosis of breast cancer cell lines	4,97E-02	ARHGDIA,PHB
Cell Morphology	cell spreading of neutrophils	1,40E-06	ALB,CORO1A
Cell Morphology	formation of lamellipodia	2,22E-03	LCP1,MAP2
Cell Morphology	structural integrity of plasma membrane	3,63E-03	NDUFS1
Cell Morphology	polarization of peripheral T lymphocyte	4,84E-03	LCP1
Cell Morphology	reorganization of actin stress fibers	6,05E-03	LCP1

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cell Morphology	transmembrane potential of mitochondria	1,32E-02	NDUFS1,PHB
Cell Morphology	mitochondrial membrane potential	1,57E-02	NDUFS1
Cell Morphology	transmembrane potential of mitochondrial membrane	1,57E-02	PHB
Cell Morphology	morphology of mitochondria	2,75E-02	NDUFS1
Cellular Development	proliferation of skin cancer cell lines	4,83E-04	ANXA6,VIP
Cellular Development	senescence of dermal fibroblasts	1,21E-03	LMNB1
Cellular Development	proliferation of dermal cells	2,53E-03	LMNB1,VIP
Cellular Development	epithelial-mesenchymal transition of lung cancer cell lines	8,46E-03	PHB
Cellular Development	proliferation of dermal fibroblasts	1,09E-02	LMNB1
Cellular Development	differentiation of muscle precursor cells	2,40E-02	ALB
Cellular Development	proliferation of prostate cancer cell lines	4,36E-02	LCP1,PHB
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of skin cancer cell lines	4,83E-04	ANXA6,VIP
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of dermal cells	2,53E-03	LMNB1,VIP
Cellular Growth and Proliferation	induction of lymphoma cell lines	3,63E-03	VIP
Cellular Growth and Proliferation	colony formation of tumor cell lines	3,80E-03	ENO1,PHB,VIP
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of cells	5,67E-03	ACTG1,ANXA6,CORO1A,EIF4A1,ENO1,LCP1,LMNB1,PHB,VIP
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of dermal fibroblasts	1,09E-02	LMNB1
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of connective tissue cells	2,37E-02	LMNB1,VIP
Cellular Growth and Proliferation	colony formation of leukemia cell lines	2,52E-02	ENO1
Cellular Growth and Proliferation	colony formation of carcinoma cell lines	3,69E-02	VIP
Cellular Growth and Proliferation	colony formation of lung cancer cell lines	4,16E-02	VIP
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of prostate cancer cell lines	4,36E-02	LCP1,PHB
Gene Expression	binding of DNA endogenous promoter	7,23E-04	PHB,VIP
Gene Expression	binding of hypoxia response element	2,42E-03	ALB

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Gene Expression	binding of DNA	9,81E-03	ALB,PHB,VIP
Gene Expression	binding of C/EBP binding site	1,57E-02	ALB
Gene Expression	binding of synthetic promoter	2,99E-02	VIP

Tabelle 5 F_1: Proteine und ihre zellulären Funktionen in der Linie GM03189(-) 4 h nach Bestrahlung mit 10 Gy

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Antigen Presentation	formation of immunological synapses	8,08E-04	MSN
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	interaction of T lymphocytes	3,76E-04	EZR,MSN
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	area of focal adhesions	8,08E-04	ACTN4
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	conjugation of T lymphocytes	1,62E-03	EZR
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	conjugation of lymphoma cell lines	3,23E-03	EZR
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	detachment of lymphoma cell lines	3,23E-03	TLN1
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	attachment of fibroblasts	5,65E-03	TLN1
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	adhesion of immune cells	8,53E-03	EZR,MSN
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	binding of macrophages	8,86E-03	MSN
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	electrical resistance of endothelial cells	9,66E-03	ACTN4
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	binding of T lymphocytes	2,48E-02	MSN
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	adhesion of T lymphocytes	3,66E-02	EZR
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	assembly of intercellular junctions	3,81E-02	TLN1
Cellular Development	proliferation of tumor cells	6,21E-04	ACTN4,EZR,RUVBL1
Cellular Development	tubulogenesis of kidney cell lines	2,42E-03	EZR
Cellular Development	colony formation of glioma cells	4,04E-03	EZR
Cellular Development	proliferation of colon carcinoma cells	6,45E-03	RUVBL1
Cellular Development	expansion of hematopoietic progenitor cells	7,25E-03	STAT5A
Cellular Development	proliferation of cancer cells	7,44E-03	EZR,RUVBL1
Cellular Development	proliferation of tumor cell lines	8,20E-03	ACTN4,EZR,HK1,PLCG2,STAT5A

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cellular Development	proliferation of carcinoma cell lines	2,58E-02	HK1,PLCG2
Cellular Development	senescence of lung cell lines	3,42E-02	STAT5A
Cellular Development	senescence of fibroblast cell lines	3,97E-02	STAT5A
Cellular Development	spermatogenesis	4,36E-02	RUVBL1
Cellular Development	proliferation of neuroblastoma cell lines	4,74E-02	ACTN4
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of tumor cells	6,21E-04	ACTN4,EZR,RUVBL1
Cellular Growth and Proliferation	formation of cobblestone area-forming cells	8,08E-04	STAT5A
Cellular Growth and Proliferation	colony formation of glioma cells	4,04E-03	EZR
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of colon carcinoma cells	6,45E-03	RUVBL1
Cellular Growth and Proliferation	expansion of hematopoietic progenitor cells	7,25E-03	STAT5A
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of cancer cells	7,44E-03	EZR,RUVBL1
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of tumor cell lines	8,20E-03	ACTN4,EZR,HK1,PLCG2,STAT5A
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of cells	2,33E-02	ACTN4,EZR,HK1,PLCG2,RUVBL1,STAT5A
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of carcinoma cell lines	2,58E-02	HK1,PLCG2
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of neuroblastoma cell lines	4,74E-02	ACTN4
Cellular Movement	cell movement of bone cancer cell lines	3,56E-04	ACTN4,TLN1
Cellular Movement	cell movement of tumor cell lines	4,15E-04	ACTN4,EZR,MSN,RUVBL1,TLN1
Cellular Movement	migration of tumor cells	1,26E-03	ACTN4,EZR
Cellular Movement	migration of tumor cell lines	2,03E-03	ACTN4,EZR,MSN,RUVBL1
Cellular Movement	invasion of glioma cells	4,04E-03	EZR
Cellular Movement	migration of glioma cells	8,06E-03	EZR
Cellular Movement	invasion of breast cancer cell lines	1,27E-02	EZR,RUVBL1
Cellular Movement	migration of keratinocytes	2,08E-02	ACTN4
Cellular Movement	migration of bone cancer cell lines	2,16E-02	ACTN4
Cellular Movement	migration of squamous cell carcinoma cell lines	2,95E-02	EZR

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cellular Movement	invasion of squamous cell carcinoma cell lines	3,11E-02	EZR
Cellular Movement	adhesion of T lymphocytes	3,66E-02	EZR
Cellular Movement	migration of melanoma cell lines	4,90E-02	MSN

Tabelle 5 F_2: Proteine und ihre zellulären Funktionen in der Linie GM03189(-) 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cell Morphology	double-stranded DNA break repair of tumor cell lines	5,71E-04	RAD50,XRCC 5
Cell Morphology	area of focal adhesions	1,27E-03	ACTN4
Cell Morphology	area of lamellipodia	2,54E-03	ACTN4
Cell Morphology	conversion of induced pluripotent stem cells	3,81E-03	SUV39H1
Cell Morphology	conversion of fibroblasts	5,07E-03	SUV39H1
Cell Morphology	double-stranded DNA break repair of prostate cancer cell lines	5,07E-03	XRCC5
Cell Morphology	polarity of keratinocytes	5,07E-03	ACTN4
Cell Morphology	permeability of mitochondria	6,34E-03	HK1
Cell Morphology	homologous recombination repair of bone cancer cell lines	1,26E-02	RAD50
Cell Morphology	electrical resistance of endothelial cells	1,51E-02	ACTN4
Cell Morphology	polarization of T lymphocytes	2,26E-02	MSN
Cellular Assembly and Organization	maintenance of telomeres	5,30E-04	RAD50,XRCC 5
Cellular Assembly and Organization	area of focal adhesions	1,27E-03	ACTN4
Cellular Assembly and Organization	formation of immunological synapses	1,27E-03	MSN
Cellular Assembly and Organization	production of cellular protrusions	1,27E-03	MSN
Cellular Assembly and Organization	area of lamellipodia	2,54E-03	ACTN4
Cellular Assembly and Organization	quantity of PML nuclear bodies	3,81E-03	STAT5A
Cellular Assembly and Organization	permeability of mitochondria	6,34E-03	HK1
Cellular Assembly and Organization	organization of chromatin	1,14E-02	SUV39H1
Cellular Assembly and Organization	length of telomeres	2,26E-02	RAD50
Cellular Assembly and Organization	binding of chromatin	3,13E-02	SUV39H1

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cellular Function and Maintenance	maintenance of telomeres	5,30E-04	RAD50,XRCC5
Cellular Function and Maintenance	double-stranded DNA break repair of tumor cell lines	5,71E-04	RAD50,XRCC5
Cellular Function and Maintenance	double-stranded DNA break repair of prostate cancer cell lines	5,07E-03	XRCC5
Cellular Function and Maintenance	organization of chromatin	1,14E-02	SUV39H1
Cellular Function and Maintenance	homologous recombination repair of bone cancer cell lines	1,26E-02	RAD50
Cellular Function and Maintenance	length of telomeres	2,26E-02	RAD50
DNA Replication, Recombination, and Repair	double-stranded DNA break repair of tumor cell lines	5,71E-04	RAD50,XRCC5
DNA Replication, Recombination, and Repair	quantity of PML nuclear bodies	3,81E-03	STAT5A
DNA Replication, Recombination, and Repair	double-stranded DNA break repair of prostate cancer cell lines	5,07E-03	XRCC5
DNA Replication, Recombination, and Repair	mismatch repair of DNA	6,34E-03	XRCC5
DNA Replication, Recombination, and Repair	DNA damage	6,40E-03	RAD50,XRCC5
DNA Replication, Recombination, and Repair	organization of chromatin	1,14E-02	SUV39H1
DNA Replication, Recombination, and Repair	instability of genomes	1,26E-02	SUV39H1
DNA Replication, Recombination, and Repair	recombination of cells	1,76E-02	RAD50
DNA Replication, Recombination, and Repair	joining of DNA	2,39E-02	RAD50
DNA Replication, Recombination, and Repair	homologous recombination	4,23E-02	RAD50
Free Radical Scavenging	production of reactive oxygen species	7,77E-05	HK1,NCF2,PLCG2,TRAP1
Free Radical Scavenging	generation of reactive oxygen species	6,40E-03	NCF2,TRAP1
Free Radical Scavenging	metabolism of superoxide	1,39E-02	NCF2
Free Radical Scavenging	accumulation of reactive oxygen species	2,88E-02	TRAP1
Free Radical Scavenging	generation of superoxide	2,88E-02	NCF2
Free Radical Scavenging	production of hydrogen peroxide	3,99E-02	PLCG2
Cellular Movement	delay in initiation of cytokinesis of cervical cancer cell lines	6,93E-04	LMNA
Cellular Movement	invasion of brain cancer cell lines	2,13E-02	ARHGDI1A

Tabelle 5 G_1: Proteine und ihre zellulären Funktionen in der Linie 4060 0,5 h nach Bestrahlung mit 1 Gy

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cell Morphology	double-stranded DNA break repair of tumor cell lines	1,13E-04	RAD50,XRC C5
Cell Morphology	double-stranded DNA break repair of prostate cancer cell lines	2,31E-03	XRCC5
Cell Morphology	morphology of tumor cell lines	4,09E-03	EZR,HSP90 AA1
Cell Morphology	homologous recombination repair of bone cancer cell lines	5,76E-03	RAD50
Cell Morphology	polarization of T lymphocytes	1,03E-02	MSN
Cell Morphology	cell flattening	1,09E-02	EZR
Cell Morphology	morphology of prostate cancer cell lines	1,21E-02	HSP90AA1
Cell Morphology	morphology of breast cancer cell lines	1,78E-02	EZR
Cell Morphology	reorganization of actin cytoskeleton	2,74E-02	EZR
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	interaction of T lymphocytes	1,87E-04	EZR,MSN
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	conjugation of T lymphocytes	1,15E-03	EZR
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	conjugation of lymphoma cell lines	2,31E-03	EZR
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	adhesion of immune cells	4,33E-03	EZR,MSN
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	binding of macrophages	6,34E-03	MSN
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	binding of T lymphocytes	1,78E-02	MSN
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	adhesion of T lymphocytes	2,63E-02	EZR
Cellular Assembly and Organization	maintenance of telomeres	1,05E-04	RAD50,XRC C5
Cellular Assembly and Organization	formation of immunological synapses	5,77E-04	MSN
Cellular Assembly and Organization	production of cellular protrusions	5,77E-04	MSN
Cellular Assembly and Organization	organization of asters	1,73E-03	EZR
Cellular Assembly and Organization	quantity of microvilli	2,31E-03	EZR
Cellular Assembly and Organization	binding of actin cytoskeleton	2,88E-03	EZR
Cellular Assembly and Organization	formation of actin bundles	8,06E-03	EZR
Cellular Assembly and Organization	length of telomeres	1,03E-02	RAD50

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cellular Assembly and Organization	reorganization of actin cytoskeleton	2,74E-02	EZR
Cellular Function and Maintenance	maintenance of telomeres	1,05E-04	RAD50,XRC C5
Cellular Function and Maintenance	double-stranded DNA break repair of tumor cell lines	1,13E-04	RAD50,XRC C5
Cellular Function and Maintenance	organization of asters	1,73E-03	EZR
Cellular Function and Maintenance	double-stranded DNA break repair of prostate cancer cell lines	2,31E-03	XRCC5
Cellular Function and Maintenance	quantity of microvilli	2,31E-03	EZR
Cellular Function and Maintenance	macropinocytosis	4,61E-03	EZR
Cellular Function and Maintenance	homologous recombination repair of bone cancer cell lines	5,76E-03	RAD50
Cellular Function and Maintenance	length of telomeres	1,03E-02	RAD50
Cellular Function and Maintenance	internalization of cells	1,78E-02	EZR
Cellular Function and Maintenance	reorganization of actin cytoskeleton	2,74E-02	EZR
DNA Replication, Recombination, and Repair	double-stranded DNA break repair of tumor cell lines	1,13E-04	RAD50,XRC C5
DNA Replication, Recombination, and Repair	DNA damage	1,30E-03	RAD50,XRC C5
DNA Replication, Recombination, and Repair	double-stranded DNA break repair of prostate cancer cell lines	2,31E-03	XRCC5
DNA Replication, Recombination, and Repair	mismatch repair of DNA	2,88E-03	XRCC5
DNA Replication, Recombination, and Repair	recombination of cells	8,06E-03	RAD50
DNA Replication, Recombination, and Repair	joining of DNA	1,09E-02	RAD50
DNA Replication, Recombination, and Repair	homologous recombination	1,95E-02	RAD50
DNA Replication, Recombination, and Repair	catabolism of ATP	2,91E-02	HSP90AA1

Tabelle 5 G_2: Proteine und ihre zellulären Funktionen in der Linie 4060 4 h nach Bestrahlung mit 1 Gy

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cell Morphology	reorganization of actin cytoskeleton	9,96E-04	EZR,MYH9
Cell Morphology	cell rounding of cervical cancer cell lines	5,88E-03	MYH9
Cell Morphology	homologous recombination repair of bone cancer cell lines	9,78E-03	RAD50
Cell Morphology	extension of lamellipodia	1,17E-02	MYH9
Cell Morphology	cell flattening	1,85E-02	EZR
Cell Morphology	double-stranded DNA break repair of tumor cell lines	2,71E-02	RAD50
Cell Morphology	morphology of breast cancer cell lines	3,00E-02	EZR
Cellular Assembly and Organization	reorganization of actin cytoskeleton	9,96E-04	EZR,MYH9
Cellular Assembly and Organization	organization of asters	2,94E-03	EZR
Cellular Assembly and Organization	quantity of microvilli	3,92E-03	EZR
Cellular Assembly and Organization	binding of actin cytoskeleton	4,90E-03	EZR
Cellular Assembly and Organization	rearrangement of actin filaments	4,90E-03	MYH9
Cellular Assembly and Organization	extension of lamellipodia	1,17E-02	MYH9
Cellular Assembly and Organization	formation of actin bundles	1,37E-02	EZR
Cellular Assembly and Organization	length of telomeres	1,75E-02	RAD50
Cellular Assembly and Organization	quantity of focal adhesions	2,23E-02	MYH9
Cellular Assembly and Organization	assembly of intercellular junctions	4,61E-02	TLN1
Cellular Function and Maintenance	reorganization of actin cytoskeleton	9,96E-04	EZR,MYH9
Cellular Function and Maintenance	organization of asters	2,94E-03	EZR
Cellular Function and Maintenance	quantity of microvilli	3,92E-03	EZR
Cellular Function and Maintenance	movement of actin filaments	4,90E-03	MYH9
Cellular Function and Maintenance	macropinocytosis	7,83E-03	EZR
Cellular Function and Maintenance	homologous recombination repair of bone cancer cell lines	9,78E-03	RAD50
Cellular Function and Maintenance	extension of lamellipodia	1,17E-02	MYH9

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cellular Function and Maintenance	length of telomeres	1,75E-02	RAD50
Cellular Function and Maintenance	double-stranded DNA break repair of tumor cell lines	2,71E-02	RAD50
Cellular Function and Maintenance	internalization of cells	3,00E-02	EZR
Cellular Function and Maintenance	assembly of intercellular junctions	4,61E-02	TLN1
Cellular Movement	cell movement of tumor cell lines	1,13E-03	EIF3A,EZR,KARS,MYH9,TLN1
Cellular Movement	transendothelial migration of effector memory T lymphocytes	1,96E-03	MYH9
Cellular Movement	T cell migration	3,84E-03	EZR,MYH9
Cellular Movement	invasion of glioma cells	4,90E-03	EZR
Cellular Movement	migration of glioma cells	9,78E-03	EZR
Cellular Movement	invasion of breast cancer cell lines	1,85E-02	EIF3A,EZR
Cellular Movement	cell movement of breast cancer cell lines	2,63E-02	EIF3A,MYH9
Cellular Movement	migration of tumor cell lines	3,05E-02	EZR,KARS,MYH9
Cellular Movement	cell movement of bone cancer cell lines	3,38E-02	TLN1
Cellular Movement	migration of squamous cell carcinoma cell lines	3,57E-02	EZR
Cellular Movement	invasion of squamous cell carcinoma cell lines	3,76E-02	EZR
Cellular Movement	adhesion of T lymphocytes	4,42E-02	EZR
RNA Post-Transcriptional Modification	aminoacylation of tRNA-Lys	9,82E-04	KARS

Tabelle 5 G_3: Proteine und ihre zellulären Funktionen in der Linie 4060 24 h nach Bestrahlung mit 1 Gy

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cellular Assembly and Organization	maintenance of telomeres	6,33E-04	RAD50, XRCC5
Cellular Assembly and Organization	formation of immunological synapses	1,39E-03	MSN
Cellular Assembly and Organization	production of cellular protrusions	1,39E-03	MSN
Cellular Assembly and Organization	formation of mitochondrial cristae	4,15E-03	IMMT
Cellular Assembly and Organization	permeability of mitochondria	6,91E-03	HK1

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cellular Assembly and Organization	rearrangement of actin filaments	6,91E-03	MYH9
Cellular Assembly and Organization	extension of lamellipodia	1,65E-02	MYH9
Cellular Assembly and Organization	length of telomeres	2,47E-02	RAD50
Cellular Assembly and Organization	quantity of focal adhesions	3,14E-02	MYH9
Cellular Function and Maintenance	maintenance of telomeres	6,33E-04	RAD50,XRC C5
Cellular Function and Maintenance	double-stranded DNA break repair of tumor cell lines	6,81E-04	RAD50,XRC C5
Cellular Function and Maintenance	double-stranded DNA break repair of prostate cancer cell lines	5,53E-03	XRCC5
Cellular Function and Maintenance	movement of actin filaments	6,91E-03	MYH9
Cellular Function and Maintenance	homologous recombination repair of bone cancer cell lines	1,38E-02	RAD50
Cellular Function and Maintenance	extension of lamellipodia	1,65E-02	MYH9
Cellular Function and Maintenance	length of telomeres	2,47E-02	RAD50
Drug Metabolism	efflux of vinblastine	5,52E-06	MSN,RDX
Drug Metabolism	activation of cytarabine	2,20E-02	HK1
Molecular Transport	efflux of vinblastine	5,52E-06	MSN,RDX
Molecular Transport	transport of mitochondrial membrane	5,53E-03	HSP90AA1
Small Molecule Biochemistry	efflux of vinblastine	5,52E-06	MSN,RDX
Small Molecule Biochemistry	catabolism of ATP	2,25E-03	HSP90AA1, MYH9
Small Molecule Biochemistry	metabolism of citric acid	4,15E-03	ACO2
Small Molecule Biochemistry	oxidation of palmitic acid	1,24E-02	IMMT
Small Molecule Biochemistry	activation of cytarabine	2,20E-02	HK1
Small Molecule Biochemistry	production of hydrogen peroxide	4,34E-02	PLCG2

Tabelle 5 H_1: Proteine und ihre zellulären Funktionen in der Linie 4060 0,5 h nach Bestrahlung mit 10 Gy

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Amino Acid Metabolism	auto-oxidation of homocysteine	4,04E-04	ALB
Amino Acid Metabolism	efflux of L-triiodothyronine	1,62E-03	ALB
Amino Acid Metabolism	efflux of levothyroxine	1,62E-03	ALB
Cell Cycle	arrest in cell division of bone cancer cell lines	4,04E-04	FUBP1
Cellular Compromise	degranulation of BMMC cells	4,04E-04	ALB
Drug Metabolism	binding of ketoprofen	4,04E-04	ALB
Drug Metabolism	quantity of midazolam	4,04E-04	ALB
Drug Metabolism	efflux of levothyroxine	1,62E-03	ALB
Drug Metabolism	hydroxylation of midazolam	1,62E-03	ALB
Drug Metabolism	metabolism of terfenadine	1,62E-03	ALB
Drug Metabolism	concentration of glutathione	5,65E-03	NDUFS1
Energy Production	auto-oxidation of homocysteine	4,04E-04	ALB
Energy Production	concentration of ATP	1,53E-02	NDUFS1
Energy Production	metabolism of ATP	2,16E-02	NDUFS1

Tabelle 5 H_2: Proteine und ihre zellulären Funktionen in der Linie 4060 4 h nach Bestrahlung mit 10 Gy

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Amino Acid Metabolism	auto-oxidation of homocysteine	8,66E-04	ALB
Amino Acid Metabolism	catabolism of L-aspartic acid	3,46E-03	GOT2
Amino Acid Metabolism	efflux of L-triiodothyronine	3,46E-03	ALB
Amino Acid Metabolism	efflux of levothyroxine	3,46E-03	ALB
Cell Cycle	arrest in cell division of bone cancer cell lines	8,66E-04	FUBP1
Cell Cycle	interaction of DNA	1,73E-03	SFPQ
Cell Cycle	cell cycle progression of prostate cancer cell lines	2,65E-02	SFPQ
Cell Morphology	cell spreading of neutrophils	7,00E-07	ALB,CORO1A
Cell Morphology	double-stranded DNA break repair of prostate cancer cell lines	3,46E-03	XRCC6
Cell Signaling	nucleation of Actin	8,66E-04	CORO1A
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	activation of vascular endothelial cells	1,46E-02	ALB
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	phagocytosis of neutrophils	1,46E-02	CORO1A
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	adhesion of neutrophils	2,99E-02	CORO1A
RNA Post-Transcriptional Modification	processing of RNA	4,08E-05	ALB,HNRNPK, HNRNPL, SFPQ

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
RNA Post-Transcriptional Modification	processing of mRNA	4,12E-03	ALB,SFPQ
RNA Post-Transcriptional Modification	polyadenylation of mRNA	1,12E-02	ALB
RNA Post-Transcriptional Modification	alternative splicing of mRNA	1,38E-02	SFPQ

Tabelle 5 H_3: Proteine und ihre zellulären Funktionen in der Linie 4060 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Amino Acid Metabolism	auto-oxidation of homocysteine	9,24E-04	ALB
Amino Acid Metabolism	efflux of L-triiodothyronine	3,69E-03	ALB
Amino Acid Metabolism	efflux of levothyroxine	3,69E-03	ALB
Cell Cycle	entry into S phase of liver cell lines	9,24E-04	MCM7
Cell Cycle	exit from M phase of cervical cancer cell lines	9,24E-04	MCM7
Cell Cycle	S phase checkpoint control of carcinoma cell lines	1,85E-03	MCM7
Cell Cycle	S phase checkpoint control of lung cancer cell lines	1,85E-03	MCM7
Cell Cycle	interaction of DNA	1,85E-03	SFPQ
Cell Cycle	entry into S phase of cervical cancer cell lines	6,45E-03	MCM7
Cell Cycle	cell cycle progression of prostate cancer cell lines	2,83E-02	SFPQ
Cell Signaling	replication of viral replicon	2,77E-04	MX1,PPIA
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	detachment of lymphoma cell lines	3,69E-03	TLN1
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	attachment of fibroblasts	6,45E-03	TLN1
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	activation of vascular endothelial cells	1,56E-02	ALB
Cell Signaling	signaling of Ca ²⁺	1,65E-02	HSPA5
Cell Signaling	quantity of Ca ²⁺	1,82E-02	HSPA5,PPIA
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	binding of embryonic cell lines	2,29E-02	PTPN1
Cell Signaling	entrance of Ca ²⁺	2,29E-02	MX1
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	binding of epithelial cell lines	2,47E-02	PTPN1
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	binding of kidney cell lines	3,81E-02	PTPN1
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	assembly of intercellular junctions	4,35E-02	TLN1
Cellular Compromise	degranulation of BMDC cells	9,24E-04	ALB

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cellular Compromise	endoplasmic reticulum stress response of leukemia cell lines	2,77E-03	HSPA5
Cellular Compromise	endoplasmic reticulum stress response of hepatoma cell lines	6,45E-03	HSPA5
Cellular Compromise	permeability transition of mitochondria	7,37E-03	HSPA5
Cellular Compromise	endoplasmic reticulum stress response of cervical cancer cell lines	9,20E-03	HSPA5
Drug Metabolism	binding of ketoprofen	9,24E-04	ALB
Drug Metabolism	quantity of midazolam	9,24E-04	ALB
Drug Metabolism	efflux of levothyroxine	3,69E-03	ALB
Drug Metabolism	hydroxylation of midazolam	3,69E-03	ALB
Drug Metabolism	metabolism of terfenadine	3,69E-03	ALB

Tabelle 5 I_1: Proteine und ihre zellulären Funktionen in der Linie 20037 0,5 h nach Bestrahlung mit 1 Gy

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Amino Acid Metabolism	synthesis of L-proline	1,56E-03	ALDH18A1
Amino Acid Metabolism	metabolism of L-glutamic acid	4,67E-03	ALDH18A1
Amino Acid Metabolism	phosphorylation of L-tyrosine	3,38E-02	PTPN6
Carbohydrate Metabolism	metabolism of fructose-1,6-diphosphate	1,56E-03	ALDOC
Carbohydrate Metabolism	metabolism of D-fructose	2,60E-03	ALDOC
Cellular Response to Therapeutics	sensitivity of erythroid progenitor cells	1,56E-03	PTPN6
Protein Folding	folding of protein	3,26E-04	ERO1L,FKBP4
Post-Translational Modification	folding of protein	3,26E-04	ERO1L,FKBP4
Post-Translational Modification	acetylation of Histone h2a	6,22E-03	RUVBL1
Post-Translational Modification	phosphorylation of L-tyrosine	3,38E-02	PTPN6
Post-Translational Modification	dephosphorylation of protein	3,68E-02	PTPN6

Tabelle 5 I_2: Proteine und ihre zellulären Funktionen in der Linie 20037 4 h nach Bestrahlung mit 1 Gy

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cell Signaling	nucleation of Actin	7,51E-04	CORO1A
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	phagocytosis of neutrophils	1,27E-02	CORO1A
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	adhesion of lymphoma cell lines	2,45E-02	PTPN6
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	adhesion of neutrophils	2,60E-02	CORO1A
Protein Folding	folding of protein	7,01E-04	ERO1L,FKBP4
Protein Synthesis	nucleation of Actin	7,51E-04	CORO1A
Post-Translational Modification	folding of protein	7,01E-04	ERO1L,FKBP4
Post-Translational Modification	nucleation of Actin	7,51E-04	CORO1A
Post-Translational Modification	acetylation of Histone h2a	8,97E-03	RUVBL1
Post-Translational Modification	phosphorylation of L-tyrosine	4,84E-02	PTPN6
Cellular Assembly and Organization	assembly of phagolysosome	7,51E-04	CORO1A
Cellular Assembly and Organization	nucleation of Actin	7,51E-04	CORO1A
Cellular Assembly and Organization	outgrowth of neurites	4,92E-02	FKBP4

Tabelle 5 I_3: Proteine und ihre zellulären Funktionen in der Linie 20037 24 h nach Bestrahlung mit 1 Gy

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cell Death and Survival	apoptosis of intestinal cell lines	1,15E-03	HSPD1
Cell Death and Survival	apoptosis of skin cell lines	5,76E-03	HSPD1
Cell Signaling	nucleation of Actin	1,15E-03	CORO1A
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	activation of PBMCs	9,20E-03	HSPD1
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	phagocytosis of neutrophils	1,95E-02	CORO1A
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	activation of B lymphocytes	2,29E-02	HSPD1

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	activation of macrophages	2,85E-02	HSPD1
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	adhesion of neutrophils	3,97E-02	CORO1A
Cellular Movement	cell movement of leukocytes	4,98E-04	CORO1A,DPYSL2,HSPD1,NARS
Cellular Movement	migration of cells	2,10E-03	CORO1A,DPYSL2,HSPD1,NARS,RUVBL1,WARS
Cellular Movement	T cell migration	5,31E-03	DPYSL2,HSPD1
Cellular Movement	cell movement of phagocytes	2,76E-02	CORO1A,NARS
Cellular Movement	migration of dendritic cells	4,19E-02	NARS
Protein Folding	folding of protein	2,97E-05	ERO1L,FKBP4,HSPD1
Protein Folding	refolding of protein	1,03E-02	HSPD1
Post-Translational Modification	folding of protein	2,97E-05	ERO1L,FKBP4,HSPD1
Post-Translational Modification	nucleation of Actin	1,15E-03	CORO1A
Post-Translational Modification	refolding of protein	1,03E-02	HSPD1
Post-Translational Modification	acetylation of Histone h2a	1,38E-02	RUVBL1

Tabelle 5 J_1: Proteine und ihre zellulären Funktionen in der Linie 20037 0,5 h nach Bestrahlung mit 10 Gy

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	integrity of junctional complexes	1,62E-03	VCL
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	detachment of cervical cancer cell lines	2,42E-03	PDCD6IP
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	activation of carcinoma cell lines	3,23E-03	EIF3A
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	formation of fibronectin matrix	4,04E-03	PDCD6IP
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	adhesion of lung cell lines	8,86E-03	PDCD6IP
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	adhesion of fibroblasts	1,05E-02	VCL

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	adhesion of embryonic cell lines	2,64E-02	PDCD6IP
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	adhesion of epithelial cell lines	2,71E-02	PDCD6IP
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	adhesion of kidney cell lines	3,11E-02	PDCD6IP
Cellular Assembly and Organization	redistribution of early endosomes	8,08E-04	PDCD6IP
Cellular Assembly and Organization	formation of fibronectin matrix	4,04E-03	PDCD6IP
Cellular Assembly and Organization	permeability of mitochondria	4,04E-03	HK1
Cellular Assembly and Organization	formation of vesicles	3,11E-02	PDCD6IP
Lipid Metabolism	quantity of lysobisphosphatidic acid	1,62E-03	PDCD6IP
Molecular Transport	quantity of lysobisphosphatidic acid	1,62E-03	PDCD6IP
Small Molecule Biochemistry	quantity of lysobisphosphatidic acid	1,62E-03	PDCD6IP
Small Molecule Biochemistry	synthesis of purine base	4,84E-03	PAICS
Small Molecule Biochemistry	activation of cytarabine	1,29E-02	HK1

Tabelle 5 J_2: Proteine und ihre zellulären Funktionen in der Linie 20037 4 h nach Bestrahlung mit 10 Gy

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cell Death and Survival	cell death	1,26E-07	ANXA4,C1QBP,ENO1,EZR,HK1,HNRNPK,HSP90B1,MSN,PHB,SND1,TCP1,TUBB,UBA1,VCP,YWHAZ
Cell Death and Survival	apoptosis	3,89E-06	ANXA4,C1QBP,ENO1,EZR,HNRNPK,HSP90B1,MSN,PHB,SND1,TCP1,VCP,YWHAZ
Cell Death and Survival	necrosis	7,83E-06	ENO1,EZR,HK1,HNRNPK,MSN,PHB,SND1,TCP1,TUBB,UBA1,VCP,YWHAZ
Cell Death and Survival	apoptosis of tumor cell lines	3,81E-05	ENO1,EZR,HNRNPK,MSN,PHB,SND1,TCP1,VCP,YWHAZ
Cell Death and Survival	cell death of tumor cell lines	4,78E-05	ENO1,EZR,HK1,HNRNPK,MSN,PHB,SND1,TCP1,VCP,YWHAZ
Cell Death and Survival	cell death of cervical cancer cell lines	1,06E-04	EZR,HNRNPK,MSN,TCP1,VCP
Cell Death and Survival	apoptosis of cervical cancer cell lines	4,67E-04	EZR,HNRNPK,MSN,TCP1

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cell Death and Survival	apoptosis of lymphoma cell lines	1,11E-03	EZR,MSN,YWHAZ
Cell Death and Survival	apoptosis of breast cancer cell lines	7,74E-03	PHB,SND1,VCP
Cell Death and Survival	cell death of bone marrow cell lines	8,29E-03	TUBB
Cell Death and Survival	cell viability	1,31E-02	EIF3A,HSP90B1,SND1,TCP1,VCP
Cell Death and Survival	killing of cervical cancer cell lines	1,65E-02	HNRNPK
Cell Death and Survival	apoptosis of carcinoma cells	2,33E-02	ENO1
Cell Death and Survival	cell viability of tumor cell lines	2,51E-02	EIF3A,HSP90B1,TCP1,VCP
Cell Death and Survival	apoptosis of keratinocyte cancer cell lines	3,81E-02	PHB
Cell Death and Survival	cell death of B-lymphocyte derived cell lines	4,74E-02	TUBB
Cellular Development	proliferation of tumor cell lines	5,39E-06	C1QBP,EIF3A,EZR,HK1,HNRNPK,PKP,PHB,SND1,TCP1,TUBB,UBA1
Cellular Development	proliferation of breast cancer cell lines	2,89E-04	C1QBP,EIF3A,HNRNPK,PKP,UBA1
Cellular Development	tubulogenesis of kidney cell lines	4,15E-03	EZR
Cellular Development	proliferation of endothelial cell lines	4,80E-03	EIF3A,UBA1
Cellular Development	proliferation of prostate cancer cell lines	6,33E-03	HK1,PHB,SND1
Cellular Development	colony formation of glioma cells	6,91E-03	EZR
Cellular Development	epithelial-mesenchymal transition of lung cancer cell lines	9,66E-03	PHB
Cellular Development	differentiation of leukemia cell lines	1,19E-02	C1QBP,ENO1
Cellular Development	maturation of monocyte-derived dendritic cells	1,79E-02	HSP90B1
Cellular Development	proliferation of hepatoma cell lines	2,42E-02	C1QBP,SND1
Cellular Development	proliferation of cervical cancer cell lines	2,79E-02	TCP1,TUBB

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cellular Development	proliferation of colon cancer cell lines	4,58E-02	EIF3A,UBA1
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of tumor cell lines	5,39E-06	C1QBP,EIF3A,EZR,HK1,HNRNPK,PFKP,PHB,SND1,TCP1,TUBB,UBA1
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of cells	7,68E-06	ANXA11,C1QBP,EIF3A,ENO1,EZR,HK1,HNRNPK,MTHFD1,PFKP,PHB,SND1,TCP1,TUBB,UBA1
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of breast cancer cell lines	2,89E-04	C1QBP,EIF3A,HNRNPK,PFKP,UBA1
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of endothelial cell lines	4,80E-03	EIF3A,UBA1
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of prostate cancer cell lines	6,33E-03	HK1,PHB,SND1
Cellular Growth and Proliferation	colony formation of glioma cells	6,91E-03	EZR
Cellular Growth and Proliferation	colony formation of cells	1,42E-02	ENO1,EZR,PHB
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of hepatoma cell lines	2,42E-02	C1QBP,SND1
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of cervical cancer cell lines	2,79E-02	TCP1,TUBB
Cellular Growth and Proliferation	colony formation of leukemia cell lines	2,87E-02	ENO1
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of colon cancer cell lines	4,58E-02	EIF3A,UBA1
Cellular Movement	cell movement	7,40E-06	C1QBP,EIF3A,EZR,HNRNPK,MSN,PHB,PREX1,VCL,VCP,YWHAZ
Cellular Movement	cell movement of tumor cell lines	1,31E-05	C1QBP,EIF3A,EZR,HNRNPK,MSN,PHB,PREX1,VCP
Cellular Movement	migration of cells	2,26E-05	C1QBP,EZR,HNRNPK,MSN,PHB,PREX1,VCL,VCP,YWHAZ
Cellular Movement	migration of tumor cell lines	3,58E-05	C1QBP,EZR,HNRNPK,MSN,PHB,PREX1,VCP
Cellular Movement	migration of cytotrophoblastic cells	1,39E-03	C1QBP
Cellular Movement	migration of cortical neurons	2,77E-03	PREX1
Cellular Movement	migration of cervical cancer cell lines	3,41E-03	PHB,PREX1
Cellular Movement	migration of lung cancer cell lines	4,68E-03	C1QBP,PHB

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cellular Movement	invasion of glioma cells	6,91E-03	EZR
Cellular Movement	invasion of tumor cell lines	1,08E-02	EIF3A,EZR,PHB,VCP
Cellular Movement	migration of glioma cells	1,38E-02	EZR
Cellular Movement	invasion of bone cancer cell lines	1,65E-02	VCP
Cellular Movement	invasion of breast cancer cell lines	3,54E-02	EIF3A,EZR
Cellular Movement	migration of bone cancer cell lines	3,68E-02	VCP
Cellular Movement	migration of fibrosarcoma cell lines	4,34E-02	HNRNPK
Free Radical Scavenging	synthesis of reactive oxygen species	3,59E-04	HK1,HNRNPK,PREX1,YWHAZ
Free Radical Scavenging	formation of reactive oxygen species	4,57E-04	PREX1,YWHAZ
Free Radical Scavenging	production of reactive oxygen species	2,03E-03	HK1,HNRNPK,YWHAZ
Free Radical Scavenging	metabolism of superoxide	1,51E-02	PREX1

Tabelle 5 J_3: Proteine und ihre zellulären Funktionen in der Linie 20037 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cell Death and Survival	cell death	1,16E-07	ANXA4,C1QBP,ENO1,EZR,HK1,HNRNPK,HSP90B1,HSPA8,MX1,P4HB,PDCD6IP,PHB,SDHA,SND1,STOML2,TCP1,TUBB,UBA1,YWHAZ
Cell Death and Survival	necrosis	1,76E-06	ENO1,EZR,HK1,HNRNPK,HSPA8,MX1,P4HB,PDCD6IP,PHB,SDHA,SND1,STOML2,TCP1,TUBB,UBA1,YWHAZ
Cell Death and Survival	apoptosis	4,30E-06	ANXA4,C1QBP,ENO1,EZR,HNRNPK,HSP90B1,HSPA8,MX1,P4HB,PDCD6IP,PHB,SND1,STOML2,TCP1,YWHAZ
Cell Death and Survival	apoptosis of tumor cell lines	4,83E-05	ENO1,EZR,HNRNPK,HSPA8,P4HB,PDCD6IP,PHB,SND1,STOML2,TCP1,YWHAZ

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cell Death and Survival	cell death of tumor cell lines	1,13E-04	ENO1,EZR,HK1,HNRNPK,HSPA8,P4HB,PDCD6IP,PHB,SND1,STOML2,TCP1,YWHAZ
Cell Death and Survival	apoptosis of cervical cancer cell lines	2,24E-03	EZR,HNRNPK,PDCD6IP,TCP1
Cell Death and Survival	cell death of immune cells	2,83E-03	EZR,MX1,STOML2,TUBB
Cell Death and Survival	apoptosis of T lymphocytes	1,23E-02	EZR,STOML2
Cell Death and Survival	cell death of bone marrow cell lines	1,24E-02	TUBB
Cell Death and Survival	cell death of striatal neurons	1,45E-02	SDHA
Cell Death and Survival	cell viability	1,99E-02	HSP90B1,MX1,P4HB,RPSA,SND1,TCP1
Cell Death and Survival	cell viability of monocyte-derived dendritic cells	2,47E-02	MX1
Cell Death and Survival	killing of cervical cancer cell lines	2,47E-02	HNRNPK
Cell Death and Survival	apoptosis of carcinoma cells	3,48E-02	ENO1
Cell Death and Survival	apoptosis of lymphoma cell lines	3,83E-02	EZR,YWHAZ
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	adhesion of lung cells	4,95E-04	C1QBP,PDCD6IP
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	attachment of lung cells	2,08E-03	C1QBP
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	binding of cytotrophoblastic cells	2,08E-03	C1QBP
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	attachment of tumor cell lines	2,26E-03	C1QBP,RPSA
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	attachment of colon cancer cell lines	4,15E-03	C1QBP
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	conjugation of T lymphocytes	4,15E-03	EZR
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	cell-cell adhesion of hepatoma cell lines	6,22E-03	C1QBP
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	detachment of cervical cancer cell lines	6,22E-03	PDCD6IP
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	attachment of melanoma cell lines	8,29E-03	RPSA

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	conjugation of lymphoma cell lines	8,29E-03	EZR
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	formation of fibronectin matrix	1,04E-02	PDCD6IP
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	signal transduction	1,86E-02	ANXA4,HNRNPK,MX1,PHB,RAN,YWHAZ
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	adhesion of lung cell lines	2,26E-02	PDCD6IP
Cellular Development	proliferation of tumor cell lines	4,32E-04	C1QBP,EZR,HK1,HNRNPK,PDCD6IP,PFKP,PHB,SND1,TCP1,TUBB,UBA1
Cellular Development	tubulogenesis of kidney cell lines	6,22E-03	EZR
Cellular Development	colony formation of glioma cells	1,04E-02	EZR
Cellular Development	tumorigenesis of cervical cancer cell lines	1,04E-02	PDCD6IP
Cellular Development	proliferation of breast cancer cell lines	1,25E-02	C1QBP,HNRNPK,PFKP,UBA1
Cellular Development	epithelial-mesenchymal transition of lung cancer cell lines	1,45E-02	PHB
Cellular Development	proliferation of prostate cancer cell lines	1,94E-02	HK1,PHB,SND1
Cellular Development	differentiation of leukemia cell lines	2,57E-02	C1QBP,ENO1
Cellular Development	maturation of monocyte-derived dendritic cells	2,67E-02	HSP90B1
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of cells	1,46E-04	C1QBP,ENO1,EZR,HK1,HNRNPK,MTHFD1,MX1,PDCD6IP,PFKP,PHB,PRDX4,RPSA,SND1,TCP1,TUBB,UBA1
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of tumor cell lines	4,32E-04	C1QBP,EZR,HK1,HNRNPK,PDCD6IP,PFKP,PHB,SND1,TCP1,TUBB,UBA1
Cellular Growth and Proliferation	colony formation of glioma cells	1,04E-02	EZR
Cellular Growth and Proliferation	tumorigenesis of cervical cancer cell lines	1,04E-02	PDCD6IP
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of breast cancer cell lines	1,25E-02	C1QBP,HNRNPK,PFKP,UBA1

Kategorie	Funktion	P-Wert	Proteine
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of prostate cancer cell lines	1,94E-02	HK1,PHB,SND1
Cellular Growth and Proliferation	colony formation of cells	4,16E-02	ENO1,EZR,PHB
Cellular Growth and Proliferation	colony formation of leukemia cell lines	4,28E-02	ENO1
Protein Synthesis	translation of protein	1,44E-04	DARS,EIF3F,EIF4A2,HNRNPK
Protein Synthesis	translation of mRNA	8,84E-04	DARS,EIF3F,EIF4A2
Protein Synthesis	localization of reporter protein	2,08E-03	C1QBP
Protein Synthesis	initiation of translation of mRNA	2,82E-03	EIF3F,EIF4A2
Protein Synthesis	initiation of translation of protein	2,82E-03	EIF3F,EIF4A2

Tabelle 6 A: Differentielle MiRNA-Expression in der Linie GM03223(+) 4 h und 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy. Hochregulierte miRNAs sind rot, herunterregulierte miRNAs sind grün dargestellt.

miRNA	4 h	miRNA	24 h
hsa-miR-636	0,00444882	hsa-miR-125a-5p-4395309	0,14564351
hsa-miR-125a-5p	0,05402934	hsa-miR-191-4395410	0,18167164
hsa-let-7a	0,16847426	hsa-miR-194-4373106	0,26313998
hsa-miR-339-5p	0,25140414	hsa-miR-625-4395542	0,28855758
hsa-miR-15b	0,26377048	hsa-miR-345-4395297	0,28943162
hsa-miR-590-5p	0,30012647	hsa-let-7b-4395446	0,29396943
hsa-miR-532-5p	0,31152604	hsa-let-7a-4373169	0,42253111
hsa-miR-10a	0,34404407	hsa-miR-15b-4373122	0,54088921
hsa-miR-425	0,36571372	hsa-miR-886-3p	1,87229814
hsa-miR-194	0,38306728	hsa-miR-103	2,28153097
hsa-miR-29c	0,40623564	hsa-miR-140-5p	2,40585001
hsa-miR-191	0,42990822	hsa-miR-301a	3,80096843
hsa-miR-150	0,43978062	hsa-miR-34a	5,46583272
hsa-miR-192	0,47697436	hsa-miR-532-3p	6,18390691
hsa-miR-16	0,56945299		
hsa-miR-103	2,44863426		
hsa-miR-132	3,55710554		
hsa-miR-18a	3,57556432		

miRNA	4 h	miRNA	24 h
hsa-miR-598	4,89125651		
hsa-miR-33b	10,5600104		
hsa-miR-107	11,032128		

Tabelle 6 B: Differentielle MiRNA-Expression in der Linie GM03189(-) 4 h und 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy. Hochregulierte miRNAs sind rot, herunterregulierte miRNAs sind grün dargestellt.

miRNA	4 h	miRNA	24 h
hsa-miR-124	0,13234059	hsa-miR-32	0,00013056
hsa-miR-29a	0,24087723	hsa-miR-34a	0,04979868
hsa-let-7a	0,29994949	hsa-miR-328	0,12090924
hsa-miR-625	0,37524475	hsa-let-7a	0,1561435
hsa-miR-181a	0,44631676	hsa-miR-99a	0,23373706
hsa-miR-425	0,44974253	hsa-miR-500	0,45079466
hsa-let-7d	2,89947952	hsa-miR-425	0,50450369
hsa-miR-148a	3,38499654	hsa-miR-628-5p	4,72468765
hsa-miR-185	3,40055694	hsa-let-7d	5,18044818
hsa-miR-29b	17,8656448	hsa-miR-195	6,37757923

Tabelle 6 C: Differentielle MiRNA-Expression in der Linie 4060 4 h und 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy. Hochregulierte miRNAs sind rot, herunterregulierte miRNAs sind grün dargestellt.

miRNA	4 h	miRNA	24 h
hsa-let-7g	0,4703457	hsa-let-7g	0,38752476
hsa-miR-28-3p	0,28197681	hsa-miR-10a	0,00082802
hsa-miR-33b	0,09155639	hsa-miR-19a	0,41540238
hsa-miR-99a	0,30279713	hsa-miR-19b	0,44034293
hsa-miR-124	0,04151649	hsa-miR-20a	0,48163742
hsa-miR-125a-5p	0,38332378	hsa-miR-21	0,4390939
hsa-miR-146b-3p	0,00769716	hsa-miR-26b	0,49498935
hsa-miR-200c	0,35673098	hsa-miR-29c	0,38331846
hsa-miR-221	0,27642412	hsa-miR-30c	0,37570062
hsa-let-7b	0,07265241	hsa-miR-101	0,10163762
hsa-miR-345	0,03570514	hsa-miR-103	0,38242809
hsa-miR-362-5p	0,36356606	hsa-miR-125a-5p	0,10373966
hsa-miR-374a	0,1090654	hsa-miR-195	0,1437933
hsa-miR-374b	0,45686234	hsa-miR-200c	0,3033164
hsa-miR-422a	0,40361856	hsa-miR-210	0,41117014
hsa-miR-494	0,25860632	hsa-miR-339-5p	0,49123811

miRNA	4 h	miRNA	24 h
hsa-miR-532-3p	0,46335872	has-miR-155	0,1497678
hsa-miR-625	0,27807817	hsa-let-7b	0,02516636
hsa-miR-628-5p	0,19348081	hsa-miR-362-5p	0,08253526
hsa-miR-652	0,42011827	hsa-miR-374a	0,21339679
hsa-miR-660	0,20911398	hsa-miR-374b	0,48506211
hsa-miR-34c-5p	18,8870885	hsa-miR-450b-5p	0,46387577
hsa-miR-99b	8,56164144	hsa-miR-454	0,45647204
hsa-miR-125a-3p	2,20370394	hsa-miR-532-3p	0,08851995
hsa-miR-127-5p	5,40039306	hsa-miR-598	0,12298655
hsa-miR-130b	5,61518057	hsa-miR-625	0,38451197
hsa-miR-132	2,96399788	hsa-miR-652	0,25995583
hsa-miR-139-5p	6,75815489	hsa-miR-660	0,22074282
hsa-miR-149	17,3432145	hsa-miR-34a	7,06853089
hsa-miR-188-3p	2,69463229	hsa-miR-34c-5p	30,9381151
hsa-miR-192	2,11420961	hsa-miR-98	2,3002129
hsa-miR-197	3,59066838	hsa-miR-122	4,0470829
hsa-miR-361-5p	13,0167774	hsa-miR-130b	7,55055347
hsa-miR-483-5p	13,2255005	hsa-miR-132	3,12182875
hsa-miR-486-3p	5,54344343	hsa-miR-139-5p	5,25711174
hsa-miR-491-5p	3,44755225	hsa-miR-146b-3p	5,41661819
hsa-miR-636	3,72338401	hsa-miR-181c	5,86736767
hsa-miR-886-3p	2,94919132	hsa-miR-188-3p	5,24285411
		hsa-miR-192	2,29030288
		hsa-miR-221	6,64876045
		hsa-miR-483-5p	5,37653387
		hsa-miR-532-5p	5,48411719
		hsa-miR-886-3p	3,03622857

Tabelle 6 D: Differentielle MiRNA-Expression in der Linie 20037 4 h und 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy. Hochregulierte miRNAs sind rot, herunterregulierte miRNAs sind grün dargestellt.

miRNA	4 h	miRNA	24 h
hsa-miR-34c-5p	0,01530242	hsa-miR-494	6,8255E-09
hsa-miR-27a	0,04458217	has-miR-155	0,01253809
hsa-miR-25	0,16057748	hsa-miR-107	0,08214211
hsa-miR-19a	0,19845331	hsa-miR-125a-3p	0,15632364
hsa-miR-339-5p	0,22788731	hsa-miR-660	0,19964417
hsa-miR-127-5p	0,23766733	hsa-miR-19a	0,4484462
hsa-miR-19b	0,2780196	hsa-miR-422a	0,47759705
hsa-miR-422a	0,29118208	hsa-miR-886-5p	0,48040192
hsa-miR-362-5p	0,31687495	hsa-miR-15b	0,48375948
hsa-miR-148a	0,32711198	hsa-miR-34c-5p	0,48891068
hsa-miR-374a	0,33147213	hsa-miR-484	2,10948939

miRNA	4 h	miRNA	24 h
hsa-miR-29c	0,33340127	hsa-miR-671-3p	2,25916217
hsa-miR-103	0,36569365	hsa-miR-339-3p	2,61451407
hsa-miR-15a	0,38018658	hsa-miR-135b	2,91173051
hsa-miR-107	0,39482917	hsa-miR-486-3p	2,96603543
hsa-miR-345	0,39574101	hsa-miR-296-5p	3,0740483
hsa-miR-425	0,40470722	hsa-miR-139-5p	3,87601145
hsa-miR-374b	0,42605379	hsa-let-7b	4,07273468
hsa-miR-106b	0,4315371	hsa-miR-192	4,17552567
hsa-miR-18a	0,44181904	hsa-miR-130b	4,27036336
hsa-miR-331-3p	0,44187876	hsa-miR-181a	4,47839206
hsa-miR-200c	0,45050046	hsa-miR-598	4,99021797
hsa-miR-140-5p	0,47261309	hsa-miR-301b	6,98892146
hsa-miR-21	0,48118864	hsa-miR-124	17,4903085
hsa-miR-197	1,9554376	hsa-miR-34a	18,0926626
hsa-miR-339-3p	2,05284187	hsa-miR-32	32,2009162
hsa-miR-328	2,1028304		
hsa-miR-140-3p	2,51944943		
hsa-miR-671-3p	2,76583578		
hsa-miR-181a	2,99994385		
hsa-miR-886-3p	3,10201035		
hsa-miR-628-5p	3,20291053		
hsa-miR-501-5p	3,39724555		
hsa-miR-449a	5,0657276		
hsa-miR-301b	5,46913434		
hsa-miR-330-3p	11,0465541		

Tabelle 7: 4 gewählte SNPS der Genotypisierung in allen WST-1 gemessenen LUCY-Zelllinien

ID	24 h 10 Gy	48 h 10 Gy	Gruppe	Alter	geschl	ATM_1 rs228589	ATM_3 rs1800889	NBS_1 rs709816	NBS_5 rs1805796
3008	76,86	67,26	Indexpatient	42	2	2		0	0
4008	46,41	38,26	Indexpatient	43	2	2	0	1	1
4013	70,57	45,90	Indexpatient	41	2	2	0	1	1
4017	64,38	44,24	Indexpatient	47	2	0	0	1	1
4028	52,91	40,58	Indexpatient	49	2	2	0	1	1
4029	58,45	51,26	Indexpatient	49	2				
4037	57,93	52,85	Indexpatient	47	2	1	1	1	1
4039	44,36	38,98	Indexpatient	41	2	1	1	1	1
4040b	62,46	59,55	Indexpatient	45	1	0	0	1	1
4040a	44,88	35,11	Indexpatient	45	1	0	0	1	1
4048	49,95	47,26	Indexpatient	47	2	1	1	1	1
4049	66,97	50,71	Indexpatient	43	1	1	0	2	2
4054	60,26	49,78	Indexpatient	36	1	1	0	0	0

ID	24 h 10 Gy	48 h 10 Gy	Gruppe	Alter	geschl	ATM_1 rs228589	ATM_3 rs1800889	NBS_1 rs709816	NBS_5 rs1805796
4060	36,97	27,65	Indexpatient	37	2	1	0	0	0
4064	54,55	50,34	Indexpatient	39	1	1	0	1	1
4068	72,85	57,24	Indexpatient	45	2	1	0	2	2
4095	76,26	65,00	Indexpatient	48	2	2	0	2	2
4104	59,03	53,14	Indexpatient	44	1	1	0	0	0
4109	59,57	53,01	Indexpatient	43	1	1	0	0	0
4113	54,48	51,39	Indexpatient	47	1	2	0	1	1
4119	64,79	54,69	Indexpatient	36	1	2	0	1	1
4120	63,90	50,88	Indexpatient	37	2	1	0	0	0
5003	55,65	52,57	Indexpatient	40	1	1	0	0	0
6008	59,75	46,35	Indexpatient	38	1	1	0	1	1
7005	63,25	58,34	Indexpatient	49	2	0	0	0	0
8001	63,56	59,57	Indexpatient	46	2	1	0	1	1
8002	65,38	51,69	Indexpatient	50	1	0	0	1	1
8003	62,88	57,41	Fall	50	1	1	0	0	0
8035	70,90	59,30	Indexpatient	50	1	2	0	0	0
8039	59,40	43,79	Indexpatient	49	2	1	0	1	1
8041	65,33	54,80	Indexpatient	45	1	2	1	0	0
8042	64,48	48,21	Indexpatient	50	1	2	0	2	2
8044	59,18	46,09	Indexpatient	49	1	0	0	1	1
8050	46,65	47,72	Indexpatient	44	1	1	0	1	1
8059	47,20	48,11	Indexpatient	45	2	0	0	1	1
8063	66,14	55,75	Indexpatient	36	1	2	0	1	1
8077	60,55	57,69	Indexpatient	49	1	1	0	1	1
9004	53,17	45,35	Indexpatient	41	2	0	0	0	0
9012	52,47	47,42	Indexpatient	44	1	0	0		1
11031	74,65	68,59	Indexpatient	50	2	2	0	1	1
12018	73,55	65,59	Indexpatient	48	1	2	0	0	0
12021	58,35	50,51	Indexpatient	48	2	1	0	1	1
13004	56,65	48,61	Indexpatient	44	1	0		0	0
13007	53,45	45,77	Indexpatient	46	1	1	0	1	1
13013	65,85	59,67	Indexpatient	45	1	2	0	0	0
13019	65,24	58,40	Indexpatient	49	1	0	0	1	1
13026	59,71	47,46	Indexpatient	47	1	1	0	0	0
13044	84,64	64,14	Indexpatient	45	2	0	0	0	0
13050	68,72	53,88	Indexpatient	42	2	1	0	0	0
13060	70,55	64,36	Indexpatient	40	2	1	0	2	2
13073	71,69	70,53	Indexpatient	50	1	0	0	1	0
13074	57,76	51,48	Indexpatient	44	2	1	0	1	1
16004	68,39	66,68	Indexpatient	46	1	2	0	0	0
16034	86,37	62,33	Indexpatient	48	1	0	0	1	1
17025	74,25	68,41	Fall	33	1	1	0	0	
19006	83,49	80,44	Indexpatient	50	1	2	0	1	1
19022	56,53	54,96	Indexpatient	39	1	1	0	0	0
19033	69,04	63,36	Fall	43	1	1	0	0	
19037	78,87	62,71	Indexpatient	45	1		0	0	0
20003	66,25	56,04	Indexpatient	40	2	1	0	0	0

Anhang

ID	24 h 10 Gy	48 h 10 Gy	Gruppe	Alter	geschl	ATM_1 rs228589	ATM_3 rs1800889	NBS_1 rs709816	NBS_5 rs1805796
20007	57,09	48,01	Indexpatient	43	1	1	0	0	0
20009	75,98	63,83	Indexpatient	40	1	0	0	2	2
20022	84,40	77,18	Indexpatient	46	2	2	0	0	0
20024	59,10	45,38	Indexpatient	50	2	2	0	0	0
20037	84,92	80,14	Indexpatient	47	2	0	0	0	0
20038	50,37	34,83	Indexpatient	40	1	0	0	0	0
20045	70,85	68,05	Fall	44	1	1	0	0	
20073	59,79	57,99	Fall	41	1	2	0	1	
29004	77,33	65,93	Indexpatient	38	2	0	0	0	0
29010	78,23	66,60	Indexpatient	43	1	0	0	0	0
29011	67,81	51,20	Indexpatient	44	1	0	0	0	0
29012	94,68	71,25	Indexpatient	43	1	0	0	1	1
29019	70,85	68,63	Indexpatient	42	1	2	0	0	0
29023	89,27	73,35	Indexpatient	50	1			0	0
29024	54,42	53,79	Indexpatient	40	2	1	0	1	1
29025	79,21	66,61	Indexpatient	38	2	1	0	0	0
29027	67,75	63,70	Indexpatient	45	2	1	0	0	0
29029	63,27	56,61	Indexpatient	48	2	1	0	0	0
29033	68,04	66,44	Fall	48	2	0	0	1	
32003	68,17	57,80	Indexpatient	49	1	0	0	1	1
33001	88,88	84,03	Indexpatient	49	1	2	0	0	0
34002	76,87	65,24	Indexpatient	49	1	0	0	0	0
36004	80,38	75,42	Indexpatient	42	1	0	0	1	1
36008	61,28	48,60	Indexpatient	42	1	0	0	1	1
36011	45,27	43,63	Indexpatient	42	1	0	0	0	0
36012	65,65	60,37	Indexpatient	48	1	0	0	1	1
36014	69,84	63,43	Indexpatient	45	2	0		2	2

Geschlecht: 1 = männlich; 2 = weiblich

9. Publikationen

9.1 Veröffentlichungen

The inter-individual variability outperforms the intra-individual variability of differentially expressed proteins prior and post irradiation in lymphoblastoid cell lines.

Gürtler A, Hauptmann M, Pautz S, Kulka U, Friedl AA, Lehr S, Hornhardt S, Gomolka M

Arch Physiol Biochem. 2014 Sep 1:1-10. [Epub ahead of print]

Radiation-induced alterations of histone post-translational modification levels in lymphoblastoid cell lines.

Maroschik B, Gürtler A, Krämer A, Rößler U, Gomolka M, Hornhardt S, Mörtl S, Friedl AA

Radiat Oncol. 2014 Jan 9;9:15. doi: 10.1186/1748-717X-9-15

Stain-Free technology as a normalization tool in Western Blot analysis.

Gürtler A, Kunz N, Gomolka M, Hornhardt S, Friedl AA, McDonald K, Kohn JE, Posch A.

Anal Biochem. 2013 Feb 15;433(2):105-11. doi: 10.1016/j.ab.2012.10.010. Epub 2012 Oct 19.

Ionizing radiation biomarkers for potential use in epidemiological studies.

Pernot E, Hall J, Baatout S, Benotmane MA, Blanchardon E, Bouffler S, El Saghire H, Gomolka M, Guertler A, Harms-Ringdahl M, Jeggo P, Kreuzer M, Laurier D, Lindholm C, Mkacher R, Quintens R, Rothkamm K, Sabatier L, Tapio S, de Vathaire F, Cardis E.

Mutat Res. 2012 Oct-Dec;751(2):258-86. doi: 10.1016/j.mrrev.2012.05.003. Epub 2012 Jun 4. Review.

The WST survival assay: an easy and reliable method to screen radiation-sensitive individuals.

Guertler A, Kraemer A, Roessler U, Hornhardt S, Kulka U, Moertl S, Friedl AA, Illig T, Wichmann E, Gomolka M

Radiat Prot Dosimetry. 2011 Feb;143(2-4):487-90. doi: 10.1093/rpd/ncq515. Epub 2010 Dec 23.

9.2 Posterpräsentationen

Stain-Free technology as a normalization tool in Western Blot analysis.

Guertler A, Kunz N, Gomolka M, Hornhardt S, Friedl AA, McDonald K, Kohn JE, Posch A.

15. Jahrestagung der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung, München, 2012

Examination of radiation response on protein level in lymphoblastoid cell lines

A. Guertler, N. Kunz, U. Roessler, U. Kulka, A.A. Friedl, and S. Hornhardt, M. Gomolka

14. Jahrestagung der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung, Köln, 2011

Radiation sensitivity and genetic predisposition in young lung cancer patients

S. Hornhardt, U. Roessler, A. Rosenberger, A. Guertler, U. Kulka, W. Sauter, H. Bickeboeller, T. Illig, H.-E. Wichmann, A. Kraemer, S. Moertl, A. Friedl and M. Gomolka

38th Annual Meeting of the European Radiation Research Society, Stockholm, 2010

Characterization of radiation sensitivity in lung cancer patients

A. Krämer, A. Guertler, I. Summerer, M. Gomolka, S. Hornhardt, U. Roessler, M. J. Atkinson, H.-E. Wichmann and S. Moertl

13. Jahrestagung der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung, Hamburg, 2010

The WST survival assay: an easy and reliable method to screen radiation-sensitive individuals.

Guertler A, Kraemer A, Roessler U, Hornhardt S, Kulka U, Moertl S, Friedl AA, Illig T, Wichmann E, Gomolka M

12. Jahrestagung der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung, Essen, 2009

9.3 Vorträge

A proteomic approach to identify low abundant proteins that modulate radiation sensitivity

A. Guertler, U. Kulka, S. Hornhardt, M.Gomolka

GBS Jahrestagung 2013, Darmstadt

Intra- and Interindividual Variation on Protein Level in 5 Lymphoblastoid Cell Lines with different Radiosensitivity

A. Guertler, U. Kulka, S. Hornhardt, M.Gomolka and A. A Friedl

2nd International Radiation Proteomics Workshop 2013, München

10 Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Anne Maria Dietz (geb. Gürtler)

*16.08.1981 in München

Deutsch

Ausbildung

09/12 – dato	Referentin im Fachbereich SG „Strahlenschutz und Gesundheit“, Bundesamt für Strahlenschutz, Neuherberg
01/09 – 01/12	Promotion an der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie in der Arbeitsgruppe Molekulare Strahlenbiologie Betreuer: PD. Dr. Anna A. Friedl Titel: „Charakterisierung interindividueller Strahlenempfindlichkeit in Zellen aus Tumorpatienten“
08/08 – 06/09	Vertrag als wissenschaftliche Mitarbeiterin im Bundesamt für Strahlenschutz in der Arbeitsgruppe SG 1.1 „Biologische Strahlenwirkungen, biologische Dosimetrie“
10/01 – 06/08	Studium der Biologie mit Abschluss Diplom an der Universität zu Köln
03/07 – 02/08	Diplomarbeit an der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin Klinikum Großhadern Ludwig-Maximilians-Universität München Titel: „Generierung eines murinen, monoklonalen Antikörpers gegen das Peptid <i>TN-C1</i> (P ₁₂₅₇ -V ₁₄₂₁) der tumorspezifischen Isoform des <i>humanen</i> TN-C für die Radioimmuntherapie an Gliomen“
10/01 – 03/05	Grundstudium Diplom Biologie an der Universität zu Köln
07/2001	Abitur am Edith-Stein-Gymnasium, München

11 Danksagung

Für die Betreuung meiner Arbeit und die offenen Gespräche, sowie kritischen Diskussionen möchte ich Anna Friedl herzlich danken.

Anne Krämer und Belinda Maroschik möchte ich für die gute Zusammenarbeit im Verbundprojekt danken. Sophie Drexler für die sehr lustige Zeit während der Tagungen.

Maria Gomolka und Sabine Hornhardt danke ich für die immerwährende Unterstützung in allen Lebenslagen und die Möglichkeit, weiterhin im Bereich Proteomics arbeiten zu können.

Anton Posch danke ich dafür, dass er mir in allen (Proteomics)-Belangen stark unter die Arme gegriffen hat und ich von seinem Wissen enorm profitieren konnte.

Daniel Samaga danke ich für die Unterstützung bei allen Statistikfragen, sowie der Auflösung der Berechnung der p-Werte von Ingenuity.

Susanne Schmeißer danke ich für ihre Geduld, ihr offenes Ohr, die tatkräftige Unterstützung und für ihre Freundschaft.

Nancy Braun danke ich dafür, dass sie mich mit dem Protein-„Labor-Voodoo“ vertraut gemacht hat und für sämtliche Kniffe und Tricks. Vor allem aber freue ich mich, dass aus der gemeinsamen Arbeit eine tiefe Freundschaft entstanden ist, die ich nicht missen möchte. Vielen Dank dafür.

Meiner Familie danke ich für die immer währende Unterstützung in jeglicher Hinsicht. Vor allem meinem Vater, dem ich diese Arbeit widme.

12 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation
von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist

München, den 20.11.2014

(Anne Maria Dietz)